

007254693

WPI Acc No: 1987-251700/198736

XRAM Acc No: C87-106508

Prodn. of hybrid protein comprising mature human serum albumin - having trypsin cleavable hydrophilic extension, by growing E. coli cells transformed with new inducible plasmid

Patent Assignee: GENETICA (GENE-N)

Inventor: LATTA M; MAYAUX J F; SARMIENTOS P; MAYAUX J

Number of Countries: 013 Number of Patents: 007

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 236210	A	19870909	EP 87400355	A	19870219	198736 B
FR 2594846	A	19870828	FR 862379	A	19860221	198745
JP 62275695	A	19871130	JP 8737683	A	19870220	198802
EP 236210	B	19911023				199143
DE 3773963	G	19911128				199149
US 5100784	A	19920331	US 8716651	A	19870219	199216
US 5187261	A	19930216	US 8716651	A	19870219	199309
			US 91653195	A	19910208	

Priority Applications (No Type Date): FR 862379 A 19860221

Cited Patents: EP 138437; EP 200590; 1.Jnl.Ref; EP 114506; EP 1929; EP 73646

Patent Details:

Patent No	Kind	Lat	Pg	Main IPC	Filing Notes
EP 236210	A	F	55		
				Designated States (Regional):	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE
EP 236210	B				
				Designated States (Regional):	AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE
US 5100784	A		36		
US 5187261	A		36	C07K-015/02	Div ex application US 8716651
					Div ex patent US 5100784

Abstract (Basic): EP 236210 A

Prodn. of hybrid protein (A), contg. a hydrophilic, N-terminal peptide extension terminated by a trypsin cleavage site, fused to the mature human serum albumin (HSA) sequence, comprises cultivating a strain of E. coli able to retain a plasmid which contains the nucleotide sequence coding for (A), the expression of which is controlled by an inducible bacterial promoter. Also new are (1) the plasmids pXL462; pXL641; pXL740 and pXL741 and (2) hybrid proteins expressed by these plasmids.

pXL462 contains the PL promoter; the ribosome-binding site (RBS) of the gene cII of lambda phage (lacking the tR1 transcription termination site); ATG start codon and the first 6 codons of the cII gene. It produces an (A) having the N-terminal extension of formula (Met)-Val-Arg-Ala-Asr-Lys-Arg. pXL641 contains the Ptrp promoter followed by penicillin amidase (PA) promoter; the RBS of PA and the first 6 codons of the PA gene. It produces an (A) with N-terminal extension of formula Met-Lys-Asn-Arg-Asn-Arg. pXL740 and pXL741 are similar to pXL641 but the extension is modified by directed mutagenesis to Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg or Met-Lys-Arg-Lys-Arg. The (A) formed is converted to denatured, insoluble form, then renatured and solubilised

to rearrange the sec. and tert. structures of the polypeptide chain.
(A) is treated with trypsin to give a protein having a primary
structure identical to HSA.

USE/ADVANTAGE - (A) can be converted into mature HSA.
0/11

Title Terms: PRODUCE; HYBRID; PROTEIN; COMPRIZE; MATURE; HUMAN; SERUM;
ALBUMIN; TRYPSIN; CLEAVE; HYDROPHILIC; EXTEND; GROW; COLI; CELL;
TRANSFORM; NEW; INDUCE; PLASMID

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-015/02

International Patent Class (Additional): C07H-015/12; C07H-017/00;
C07K-013/00; C07K-015/06; C12N-001/21; C12N-015/00; C12P-019/34;
C12P-021/02; C12R-001/19

File Segment: CPI

15



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11 Numéro de publication:

0 236 210
A1

12

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

13 Numéro de dépôt: 87400355.1

13 Int. Cl.: C 12 N 15/00, C 07 K 13/00

14 Date de dépôt: 19.02.87

15 Priorité: 21.02.86 FR 8602379

17 Demandeur: GENETICA, 160 Quai de Poislaie,
94340 Joinville Le Pont (FR)

16 Date de publication de la demande: 09.05.87
Bulletin 87/37

17 Inventeur: Letta, Martine, 297 Rue de Charenton-75,
F-75012 Paris (FR)
Inventeur: Maysaux, Jean-François, 21ter, Boulevard de la
République, F-92260 Fontenay aux Roses (FR)
Inventeur: Sermientos, Paolo, Via Mose Bianchi 104,
Milano (IT)

18 Etats contractants désignés: AT BE CH DE FR GB IT LI
LU NL SE

19 Membre: Pilard, Jacques et al, RHONE-POULENC
RECHERCHES Service Brevets Pharma 25, Quai Paul
Doumer, F-62408 Courbevoie Cedex (FR)

20 Procédé de préparation de la sérum albumine humaine mature.

21 Procédé de préparation de sérum-albumine humaine ma-
ture à partir d'une sérum-albumine humaine produite par voie
microbiologique sous forme de protéine fusionnée (*pseudo-
pro-SAH*).

EP 0 236 210 A1

La présente invention concerne un procédé de préparation de la sérum-albumine humaine mature à partir d'une sérum-albumine humaine produite par voie microbiologique sous forme de protéine fusionnée.

5 Il existe un grand choix d'organismes hôtes, tels que les cellules mammifères modifiées ou les micro-organismes qui peuvent potentiellement être utilisés en vue de la production en quantités importantes de protéines humaines d'une grande valeur thérapeutique.

10 L'utilisation de cellules mammifères modifiées par les techniques de l'ADN recombinant présente l'avantage de conduire à des produits très proches de ceux d'origine naturelle ; cependant la culture de ces cellules est délicate et ne peut être conduite que dans des volumes limités.

15 L'emploi de micro-organismes, tels que les bactéries, permet une fabrication à une échelle plus importante mais présente l'inconvénient de conduire à des produits qui diffèrent sensiblement des produits d'origine naturelle. Ainsi les protéines normalement glycosylées chez l'homme ne sont pas, en général, glycosylées par les bactéries [P. Berman et L.A. Laskey, Trends Biochem. Sci., 20 (1985) 10, p.51 et suivantes]. Par ailleurs, les protéines humaines exprimées à haut niveau dans des bactéries telles que E.coli acquièrent souvent une conformation non native qui s'accompagne d'une précipitation intracellulaire [R.G. Schoner et coll., Bio. Technol. (1985), 3, p.151 et suivantes ; J.M. Schoemaker et coll., EMBO J. (1985), 4, p.775 et suivantes]. Enfin, pour qu'un gène puisse s'exprimer dans une bactérie, telle que E.coli, il est indispensable de positionner un codon initiateur méthionine devant la séquence codante de la protéine mature. Généralement, ce résidu n'est pas excisé par la méthionyl aminopeptidase de E.coli [P.H. Seeburg et coll., 1985, 2, p.37 et suivantes ; J.M. Schoner et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981), 81, p.5403].

La protéine obtenue présente donc un acide aminé anormal comme premier résidu qui peut provoquer l'inhibition stérique d'une activité biologique si le début de la protéine est impliqué dans cette activité. Le résidu peut également présenter un caractère 5 immunogène néfaste à l'administration ultérieure de la protéine.

Il résulte que le choix d'une cellule-hôte dépend de la protéine spécifique que l'on veut obtenir. Dans le cas d'une protéine de valeur marchande élevée et nécessaire en quantité limitée, les cellules mammifères peuvent constituer une source particulièrement bien adaptée. Par contre dans le cas d'un produit de valeur marchande plus faible et nécessaire en quantité importante, de l'ordre de plusieurs dizaines de tonnes, telle que la sérum-albumine humaine (SAH), il paraît indispensable d'utiliser des micro-organismes tout en remédiant aux inconvénients liés à leur emploi.

15 Lorsque la SAH est exprimée à partir d'une construction génétique du type "Promoteur-Site de démarrage de traduction-ATG-Gène de la SAH mature", la protéine obtenue conserve généralement une méthionine comme résidu N-terminal. Pour éliminer la méthionine N-terminale de protéines hétérologues exprimées chez *E.coli*, plusieurs méthodes peuvent être envisagées, telles que le clivage enzymatique in vivo, l'excision protéolytique pendant ou immédiatement après le transport à travers la membrane ou bien des digestions protéolytiques ou chimiques in vivo.

Il est connu, en particulier d'après J.P. Waller, J. Mol. Biol., (1963), 7, p.483 et suivantes, que *E.coli* possède une méthionyl aminopeptidase qui excise la méthionine N-terminale d'un certain nombre de protéines. Cependant la spécificité du mécanisme est mal connue et il est supposé que ce mécanisme dépend du ou des résidus suivant la méthionine [V.M. Vogt, J. Biol. Chem. (1970), 245, p.4760 20 et suivantes ; H.J. George et coll., (1985) DNA, 4, p.273].

Les protéines sécrétées sont généralement initialement synthétisées sous forme d'une préprotéine comportant une "Séquence-signal" qui inclut le premier résidu. Cette séquence subit une excision protéolytique pendant ou immédiatement après le transport à travers la membrane. [R. Scheckman, Trends Biochem (1985), 10, p.177]. Cependant ce système ne convient généralement pas dans le cas de protéines cytoplasmiques ou hétérologues du fait des problèmes de transport dûs soit à certaines parties de la séquence primaire de la protéine [J. Tommassen et coll, EMBO J. (1985), 4, p.1041] soit à une précipitation intra-cytoplasmique trop rapide de la protéine. Par ailleurs les mécanismes impliqués dans la sécrétion de protéines par les cellules encaryotes, telles que la SAH sécrétée par les cellules hépatiques, sont vraisemblablement assez différents des mécanismes de sécrétion mis en jeu dans des microorganismes tels que les bactéries gram-négatives [N.Wickner et H. Lodish, Science (1985), 230 p.400].

Il a été également proposé d'employer des digestions chimiques ou enzymatiques afin de convertir in vitro la protéine synthétisée par la bactéries sous la forme d'une protéine fusionnée. Cette conversion a pour but l'excision spécifique d'une séquence peptidique étrangère à la protéine désirée, située en position N-terminale et contenant la méthionine comme premier résidu. Un exemple simple est celui d'une protéine qui ne possède pas naturellement de résidus méthionine [R.E. Chance et coll., "Peptides : Synthèses-Structure-Fonction", D.H. Rich et E. Gross, ed., Pierce Chem. Co, Rockford, Ill., (1981) p.721 et suivantes]. Dans ce cas, un traitement in vitro par le bromure de cyanogène permet l'excision de la méthionine N-terminale. Cependant ce cas ne se présente que très rarement dans le cas de protéines de poids moléculaire élevé.

Certaines protéases, comme la collagénase et le facteur X, reconnaissent une séquence de plusieurs acides aminés, ce qui les rend relativement spécifiques. [K. Nagai et H.C. Thogerson, *Nature* (1984), 309, p.810 et suivantes ; J. Germino et D. Bastia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984), 81, p.4692 et suivantes]. Une construction génétique permet donc de positionner la séquence reconnue par la protéase en question devant le premier acide aminé de la protéine désirée. Cette protéine fusionnée devient ainsi un substrat de la protéase, le produit principal de la réaction étant la protéine possédant en position N-terminale le même acide aminé que la protéine mature. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode réside dans le prix de la protéase surtout lorsqu'il s'agit de produire une protéine en grande quantité.

La SAH est synthétisée par les cellules humaines d'abord sous forme de prépro-SAH (figure 1). Une séquence signal de 18 acides aminés est enlevée pendant le transport de la SAH à travers le lumen du réticulum endoplasmique et il reste encore 6 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Arg- Gly- Val- Phe- Arg- Arg-) qui ne sont pas présents dans la SAH circulante. Selon S.O. Brennan et R.W. Carrell, *Biochim. Biophys. Acta* (1980), 621, p.83 et suivantes, ce propeptide ne semble jouer aucun rôle dans la sécrétion de la SAH. Il est possible qu'une deuxième protéolyse spécifique s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi ou dans la circulation sanguine, les deux résidus arginine formant le site de reconnaissance d'une protéase de spécificité analogue à celle de la trypsine. En effet, un variant, appelé "Albumine Christchurch", dû à une mutation qui transforme le dernier résidu arginine du propeptide en glutamine n'est pas converti in vivo en albumine mature mais est transformé in vitro en Glu-SAH en traitant le propeptide par une faible concentration de trypsine. Par ailleurs, la SAH mature sous forme native est résistante à la trypsine dans les même conditions [S.O. Brennan et coll., *Biochim. Biophys. Acta*, (1984) 802, p.24 et suivantes].

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, un procédé permettant de transformer en SAH mature une SAH produite par voie microbiologique sous forme de protéine fusionnée.

5 Le procédé selon la présente invention consiste :

- à modifier in vitro le gène de structure de la SAH de telle sorte qu'il possède 6 codons supplémentaires codant pour les 6 premiers acides aminés de la protéine cII du bactériophage lambda, puis à lier le gène de structure ainsi modifié à la séquence nucléotidique qui précède naturellement le gène cII dans le génome du bactériophage lambda et à un promoteur qui assure un niveau élevé de transcription,

10 15 - à produire, dans des conditions définies, au moyen d'une bactéries hôte contenant le gène modifié, une protéine hybride ("pseudo-pro-SAH") constituée par les 6 premiers acides aminés du gène cII suivis de la séquence de la SAH mature,

- à dénaturer et réduire puis renaturer la protéine hybride de façon à obtenir une protéine soluble dont la conformation est semblable à celle de la SAH d'origine naturelle, puis

20 - à modifier in vitro, au moyen de la trypsine, la protéine ainsi obtenue afin d'exciser le pseudo-pro-peptide et obtenir la SAH mature.

Il a également été trouvé que la SAH mature peut être obtenue en utilisant une extension peptidique N-terminale ("pseudo-pro-peptide") dont la séquence diffère de celle des 6 premiers acides aminés de la protéine cII du bactériophage lambda, à condition que cette extension permette une expression suffisante de la protéine fusionnée, présente l'hydrophilicité nécessaire et comporte un site de coupure par la trypsine. Par exemple, le "pseudo-pro-peptide" peut être constitué par les 5 premiers acides aminés de la séquence-signal de la pénicilline-amidase (6, si l'on compte le premier résidu méthionine).

Dans ce qui suit, la signification des termes techniques utilisés en biologie moléculaire est supposée connue (cf. par exemple J. Watson, "Biologie Moléculaire du Gène", édition française, Interéditions, 1978). Les méthodes couramment employées en 5 biologie moléculaire du gène sont décrites, par exemple, par T. Maniatis et coll., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, 1982). Dans ce qui suit seront décrites successivement la construction, les procédés d'expression du gène, la renaturation et la conversion par la trypsine de la "pseudo-pro-SAH".

10 A-CONSTRUCTION DU GENE "pseudo-pro-SAH".

1. Préparation d'ARN messager de foie

On utilise des cellules hépatiques, obtenues par exemple par biopsie, et on en extrait l'ARN messager selon la méthode décrite par exemple par V. Glisin et coll., Biochemistry (1974), 13, 15 p. 2633 et suivantes ; et par R. Deeley et coll., J. Biol. Chem. (1977), 252, p. 8310 et suivantes. On traite la biopsie par une solution de thiocyanate de guanidine 6M, et l'on purifie l'ARN total par plusieurs cycles de précipitation dans l'éthanol à -20°C, centrifugation et redissolution des culots de centrifugation.

20 On enrichit la préparation en ARN messager par plusieurs cycles de chromatographie d'affinité sur des colonnes d'oligo (dT)-cellulose, selon la technique décrite par E. Aviv et P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1972), 69, p. 1408 et suivantes. L'ARN messager ainsi isolé, contenant 1 à 2 % de l'ARN total, est conservé 25 en solution aqueuse à -70°C.

On peut déterminer la proportion d'ARN messager spécifique de la sérum-albumine humaine au sein de la population totale (par exemple par traduction in vitro d'un aliquot de la solution d'ARN dans des lysats de réticulocytes de lapin). Une méthode consiste à 30 utiliser le lysat de réticulocytes fourni par la société Amersham, suivant le protocole préconisé par ce fournisseur. On peut ainsi déterminer la fraction de protéine néoformée immunoprécipitable par des anticorps anti-albumine au sein de l'ensemble des protéines néoformées. On obtient par exemple une fraction de l'ordre de 6 %.

2. Synthèse de cDNA et clonage dans E.colia. Synthèse du premier brin

A partir de la technique de G.N. Buell et coll., J. Biol. Chem. (1978), 253, p. 2471 et suivantes, modifiée, on utilise par exemple 5 µg d'ARN messager total dans un volume final de 50 microlitres d'une solution contenant : 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM DTT, 20 mM KCl, 0,4 mM Na pyrophosphate, 1 mM de chaque nucléotide triphosphate (dNTP), 100 µg/ml de oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0,5 U/ml d'inhibiteur de ribonucléases, 50 picomoles de traceur radioactif et 40 unités de Transcriptase réverse (Société Life Science, Inc.).

La réaction de transcription réverse de l'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) se poursuit pendant 1 heure à 42°C.

Le taux de synthèse de ADNc est calculé par mesure du taux d'incorporation du traceur radioactif en molécules acido-précipitables, selon une technique connue.

Après 1 heure, on arrête la réaction par addition d'EDTA (20 mM), et l'on détruit l'ARN messager par digestion alcaline dans 50 mM de NaOH, à 42°C, pendant 3 heures.

On sépare l'ADNc néoformé des dNTPs non-incorporés et des produits de dégradation alcaline des ARNs par chromatographie, par exemple, sur une colonne de Sephadex G100 (Pharmacia Fine Chemicals). On obtient 1,5 µg d'ADNc simple brin à partir de 5 µg d'ARN messager total.

b. Synthèse du deuxième brin

L'ADNc simple brin est converti en ADN double brin par action du fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I.

Les conditions de réaction sont : 100 mM Hepes pH 7, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 70 mM KCl, 0,5 mM de chaque dNTP, et 30 50 unités du fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I (commercialisée par exemple par la Société New England Biolabs Inc.).

La réaction est poursuivie pendant 15 heures, à 15°C, et l'on sépare l'ADN double brin des dNTPs non incorporés à nouveau par chromatographie sur colonne de Sephadex G100.

c. Clonage de l'ADN double brin

Pour supprimer les molécules d'ADN simple brin et obtenir un ADN double brin à extrémités franches, on traite les séquences non appariées par la nucléase S_1 selon la technique 5 décrite par A. Efstradiatis et coll., Cell (1976), 7, p. 279 et suivantes. On sépare les ADNs néoformés double brin selon leur taille par centrifugation dans un gradient de saccharose. On utilise généralement un gradient de 5 % - 20 % de saccharose en 50 mM 10 Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA, 800 mM NaCl, centrifugé à 210000 g pendant 15 heures, à 20°C, et on effectue un fractionnement du gradient en aliquote après centrifugation.

On contrôle la taille des molécules dans chaque fraction par électrophorèse d'échantillons faite en parallèle avec des étalons d'ADN de tailles connues, et l'on regroupe les fractions 15 contenant un ADN constitué par l'enchaînement de plus de 500 paires de bases.

Pour permettre le clonage de cet ADN on allonge d'abord ses extrémités 3' avec de l'oligo(dC), et on allonge parallèlement les extrémités 3' du site $FstI$ du plasmide vecteur pBR322 avec de 20 1'oligo(dG) selon la technique de F. Rougeon et coll., J. Biol. Chem. (1977), 252, p. 2209 et suivantes.

On hybride alors l'ADN double brin décrit ci-dessus au plasmide vecteur, selon par exemple la technique de L. Villa 25 Komaroff et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978), 75, p. 3727 et suivantes.

On crée une "banque" de clones d'ADNcs de foie par transformation de la bactéries E.coli avec l'ADN ainsi décrit selon la méthode décrite par M. Mandel et A. Higa, J. Mol. Biol. (1970), 53, p. 154 et suivantes et M. Dagert et S.D. Erlich., Gene (1979), 30 6, p. 23 et suivantes.

d. Repérage des clones d'ADNc albumine

On utilise une technique d'hybridation sur colonies à l'aide d'oligonucléotides synthétiques dont les séquences sont déduites de la séquence protéique de l'albumine humaine (B. Meloun et coll., FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Grunstein et D. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1975), 72, p. 3961 et suivantes ; R.B. Wallace et coll., Nucleic Acids Res. (1981), 9, p. 879 et suivantes).

Les clones sont cultivés par séries de 96 sur milieu de Luria contenant 25 µg/ml de tétracycline, en boîtes carrées, directement sur des filtres de nitrocellulose. Après croissance à 37°C puis amplification en présence de 250 µg/ml de chloramphénicol, les colonies sont lysées par la soude puis hybridées avec les oligonucléotides radioactifs en 5' par kination, dans une solution contenant : 5 X SSC, 0,5 % NP 40, 100 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé par ébullition et refroidi rapidement dans la glace, 0,5 ng/ml d'oligonucléotide kinase. L'hybridation est effectuée à 37°C pendant 18 heures. On lave ensuite les filtres en 5 X SSC, à 25°C, puis 37°C, puis 45°C et ce pendant quatre fois 15 minutes à chaque étape.

Les filtres sont alors exposés sur films Kodak X-OMAT, à -70°C, avec un écran amplificateur pendant 15 à 24 heures. Les clones hybrides avec les sondes sont réisolés puis lysés. L'ADN plasmidique est purifié par centrifugation en milieu chlorure de césium-bromure d'éthidium selon une technique connue.

On séquence l'ADN de l'insertion par la technique de Maxam-Gilbert (A. Maxam et W. Gilbert, Methods Enzymol. (1980), 65, p. 499 et suivantes) pour comparer la séquence protéique dérivée de la séquence nucléotidique et celle de la sérum-albumine humaine.

On identifie ainsi une série de clones dont les insertions correspondent à l'ensemble du gène de la sérum-albumine humaine.

Dans la figure 2 est représentée la carte de restriction du gène de la sérum-albumine, ainsi que la position de trois des insertions les plus représentatives, désignées par "pT1B11", "pAA38", "p6D8".

5 e. Incorporation au gène de structure d'un codon d'initiation (figure 3)

a) On digère l'ADN du plasmide "pT1B11" par les enzymes PstI et PvuII, et on isole un fragment d'ADN de 125 paires de bases, correspondant à la séquence de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine (acides aminés n° 1 à 62). On fixe à l'extrémité PvuII une séquence de jonction constituée du site de reconnaissance de l'enzyme BamHI. On obtient ainsi un fragment PstI-BamHI.

10 On prépare d'autre part un oligonucléotide synthétique ayant 21 bases de long, possédant un triplet "ATG" devant les nucléotides codant pour les acides aminés de la sérum-albumine humaine ainsi qu'un site de restriction NcoI, et dont la séquence est la suivante : 5'GAATCCATGGATGCACACAAG 3'.

15 On dénature le fragment d'ADN PstI-BamHI, et on l'hybride avec l'oligonucléotide synthétique. L'hybridation se fait par la séquence 5'...GATCCACACAAG 3', l'extrémité 3' du brin d'ADN complémentaire étant désappariée. On digère les extrémités désappariées, puis on polymérisé dans le sens 5'...3' avec le fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I, d'après les techniques de H. Jacobsen et coll., Eur. J. Biochem. (1974), 45, p. 623 et suivantes.

20 On obtient ainsi un fragment contenant en 5' une extrémité franche, un site NcoI puis le triplet ATG et en 3' un site BamHI.

25 b) On réalise la ligation de trois fragments d'ADN :

30 1) un fragment EcoRI-BamHI du plasmide "pLG200" (L. Guarente et coll., Cell (1980) 20, p. 543 et suivantes) portant un gène de résistance aux antibiotiques, l'origine de réplication et l'extrémité 3' du gène de la β -galactosidase,

2) un fragment EcoRI-PvuII du plasmide "pGL101" (G. Lauer et coll., J. Mol. Appl. Genet. (1981), 1, p. 139 et suivantes) portant le promoteur P_{lac} et le site de fixation de ribosome (RBS) du gène lacZ d'*E.coli*.

5 3) le fragment d'ADN mutagénisé codant pour les 62 premiers acides aminés de l'albumine humaine.

On isole un plasmide (pXL52) qui réalise une fusion de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine humaine avec le gène de la β -galactosidase d'*E.coli*.

10 f. Construction du gène complet (figure 3)

On digère l'ADN du plasmide "p6D8" par EcoRI, et partiellement par BglIII, selon une technique déjà décrite. On isole le grand fragment EcoRI-BglIII contenant la séquence codant pour les 405 derniers acides aminés de la sérum-albumine humaine puis l'origine de replication du plasmide et le gène de résistance à la tétracycline.

On digère l'ADN du plasmide "pXL52" décrit ci-dessus par EcoRI et Sau3A, et on isole un fragment contenant 200 paires de bases.

20 On digère l'ADN du plasmide "pAA38" par Sau3A et on isole un fragment contenant 540 paires de bases.

On ligature les trois fragments (dans l'ordre [pXL52 EcoRI-Sau3A] - [pAA38-Sau3A] - [p6D8 BglIII-EcoRI]) en tirant profit de la compatibilité entre les sites Sau3A et BglIII. On obtient un plasmide appelé "pXL53", dont la qualité de la construction est contrôlée par un séquençage complet du fragment compris entre le site EcoRI et le site PstI correspondant à la jonction de l'insertion et du plasmide vecteur.

25 La séquence nucléotidique complète, ainsi que la séquence protéique dérivée, sont représentées dans les figures 4 et 5.

Les variations observées entre cette séquence et la séquence protéique publiée (B. Meloun et coll, FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Dayhoff, Atlas of Protein sequence and structure (1978), 5, supplément 3, p. 306) sont les suivantes :

5	<u>Position</u>	<u>Meloun et coll.</u>	<u>Sérum-albumine humaine déduite de la séquence de "pXL53"</u>
	131	Glutamine	Acide glutamique
	364	Histidine	Alanine
	367	Tyrosine	Histidine
10	370	Alanine	Tyrosine
	381	Valine	Méthionine
	464	Acide glutamique	Histidine
	465	Histidine	Acide glutamique
	501	Glutamine	Acide glutamique

15. 3. Construction de systèmes d'expression de la méthionyl-sérum-albumine humaine

a. Utilisation du promoteur "^P_L" du bactériographe lambda

On linéarise le plasmide "pXL53" par digestion partielle par l'enzyme NcoI, en ne considérant que le site NcoI en 5' du 20 codon d'initiation et on forme des bords francs par remplissage selon la technique de R.M. Wartell et W.S. Reznikoff, Gene (1980), 9, p. 307 et suivantes.

On synthétise un "adaptateur" contenant en 5' une 25 séquence correspondant au site de reconnaissance d'une enzyme de restriction telle que BamHI, puis une séquence correspondant à un site de fixation de ribosomes (RBS "consensus" ou "théorique"). La séquence de l'adaptateur est : 5'GGATCCTAGGAGGAAC 3'.

La ligation de l'adaptateur en 5' d'un ADN à bords francs a été décrite, par exemple, par C.P. Bahl et coll., Gene 30 (1976), 1, p. 81 et suivantes.

La méthode consiste à effectuer la réaction sur 20 microlitres d'une solution contenant 50 mM Tris, HCl pH = 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 15 mM DTT, 1mM ATP, 50 μ g/ml d'adaptateur, 20 μ g/ml d'ADN et 1 unité d'ADN-ligase (New England Biolabs Inc.). La réaction est 5 poursuivie pendant 10 heures à 15°C. Cette ligation crée un site BamHI sans supprimer le site NcoI.

On digère le produit de ligation par BamHI et par HinDIII. Du fait de la présence d'un site HinDIII en 3' du gène de la sérum-albumine humaine, on obtient un fragment d'ADN contenant la 10 totalité de la séquence codante.

On sous-clone le fragment HinDIII-BamHI ainsi obtenu par exemple dans le plasmide "pBR322" en transformant E.coli selon la méthode déjà décrite ci-dessus pour obtenir le plasmide "pXL61".

Le plasmide "pXL61" ne contient pas de promoteur.

15 Le promoteur " P_L " du bactériophage lambda est placé sur le chromosome du bactériophage entre un site Bgl II et un site BamHI (voir E. Szybalski et W. Szybalski, Gene (1979) 7, p. 217 et suivantes), et dont la séquence nucléotidique est connue (F. Sanger et coll., J. Mol. Biol. (1982), 162, p. 279 et suivantes). On peut 20 cloner ce fragment et modifier ses sites de restriction selon des méthodes connues.

On note que les plasmides portant P_L doivent être propagés dans des souches de E.coli portant le gène répresseur cl, ceci afin d'éviter que ce promoteur ne s'exprime de façon constitutive.

25 Dans une première construction, P_L est disponible sous forme d'un fragment BamHI à partir du plasmide "pPL-lambda" (Pharmacia P.L. Biochemicals). L'insertion de ce fragment BamHI dans le site BamHI du plasmide "pXL61" permet d'obtenir le plasmide "pXL65", 30 dans lequel on a vérifié que l'orientation du promoteur par rapport au gène de structure de la sérum-albumine humaine est correcte.

D'autres constructions peuvent être réalisées à partir de plasmides disponibles. On peut, par exemple, exciser du plasmide "p_{P_L}-lambda" un fragment HaeIII-HaeIII contenant le promoteur P_L et l'insérer dans le site SmaI d'une séquence de clonage multisites portée sur un plasmide, tel que le plasmide "pUC8" (J. Vieira et J. Messing, Gene, (1982), 79, p. 259 et suivantes) pour obtenir "pUC8-P_L" dans lequel le site EcoRI est en 5' du promoteur.

A partir du plasmide "pPS1" (P. Sarmientos et coll., Cell (1983), 32, p. 1337 et suivantes), on peut d'abord détruire le site HinDIII le plus proche du site NdeI (figure 3) puis remplacer le petit fragment EcoRI-HinDIII par, d'une part, le fragment EcoRI-BamHI du plasmide "pUC8-P_L" contenant le promoteur P_L, et, d'autre part, le fragment BamHI-HinDIII du plasmide "pXL61" contenant le gène de la sérum-albumine. On obtient ainsi le plasmide "pXL70" dans lequel l'ensemble P_L-RBS "consensus"-ATG-gène de la sérum-albumine humaine est porté sur un fragment d'ADN EcoRI-HinDIII.

b. Remplacement du RBS "consensus" par celui du gène cII du bactériophage lambda

Le gène cII du bactériophage lambda, dont la séquence et le site d'initiation sont connus, peut être traduit avec efficacité (E. Schwarz et coll., Nature (1978), 272, p. 410 et suivantes).

On construit un plasmide contenant le système d'expression "Promoteur "P_L" - RBS cII - ATG - gène sérum-albumine".

Par exemple, on peut après avoir détruit le site BamHI de "pUC8-P_L" par action de l'enzyme S1 (A.J. Berk et P.A. Sharp, Cell (1977), 12, p. 72) isoler un fragment EcoRI-HinDIII contenant le promoteur P_L et ensuite lier ce fragment avec le grand fragment EcoRI-HinDIII du plasmide "pDS20" (G. Duester et coll., Cell (1982), 30, p. 855 et suivantes), pour obtenir le plasmide "pXL73".

Le RBS du gène cII est extrait du plasmide "pPS1". On digère ce plasmide par NdeI et on insère un adaptateur BamHI après formation d'extrémités franches. On excise alors le RBS sous forme d'un fragment HinDIII-BamHI.

On construit d'abord un plasmide "pXL88" dans lequel ce fragment HindIII-BamHI est lié au grand fragment HindIII-BamHI du plasmide "pXL73". Dans le nouveau plasmide "pXL88", le RBS cII est inséré dans la bonne orientation par rapport au promoteur P_L , le tout dans un système multisteles de telle sorte que l'ensemble P_L -RBS cII soit porté sur un fragment d'ADN EcoRI-BamHI de 578 paires de bases.

Le fragment EcoRI-BamHI de 578 paires de bases est sous-cloné entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide "pMC1403" (M.J. Casadaban et coll., J. Bacteriol. (1980), 143, p. 971 et suivantes) qui porte le gène de la β -galactosidase (lacZ) après le site BamHI. Cette construction conduit au plasmide "pXL91" dans lequel le gène de la β -galactosidase est exprimé sous contrôle du système " P_L -RBS cII".

On sous-clone le fragment BamHI-BglII du plasmide "pXL61" décrit précédemment dans le site BamHI du plasmide "pMC1403". (La ligation d'un site BglII dans un site BamHI est possible, mais l'excision par BamHI en BglII ne l'est plus ; il ne reste donc qu'un site BamHI).

Cette construction ("pXL71") aboutit à l'insertion d'un fragment d'ADN de 700 paires de bases comportant la séquence "BamHI-[RBS "consensus"-ATG-NcoI-gène partiel de la sérum-albumine (codant pour les acides aminés 1 à 218)-gène de la β -galactosidase].

On coupe ce plasmide par BamHI et SacI (le site SacI est présent dans le gène de la β -galactosidase) et on l'insère dans le plasmide "pXL91" décrit précédemment à la place du fragment préexistant BamHI-SacI.

On aboutit alors au plasmide "pXL97" dont l'insertion a la structure suivante : "Site EcoRI - P_L - RBS cII - site BamHI - RBS "consensus"- site NcoI - ATG - gène partiel de la sérum-albumine -gène de la β -galactosidase".

On digère le plasmide "pXL97" par BamHI et partiellement par NcoI en ne considérant que le site NcoI proche du codon d'initiation et on forme les bords francs par action de la nuclease S1, puis on le referme sur lui-même. Cette manipulation, d'une part, 5 supprime la séquence d'ADN du RBS "consensus" et, d'autre part, met en phase un ATG du RBS cII avec la séquence de la sérum-albumine.

On obtient ainsi le plasmide "pXL136" qui comporte la séquence "site EcoRI- P_L -RBS cII-ATG-gène partiel de la sérum-albumine-gène de la β -galactosidase".

10 Le gène partiel de la sérum-albumine possédant un site PvuII, on digère le plasmide "pXL136" par EcoRI et PvuII et on extrait un fragment de 760 paires de bases qui est inséré entre les sites EcoRI et PvuII du plasmide "pXL70" décrit précédemment. On obtient ainsi le plasmide "pXL139" qui porte la structure " P_L -RBS 15 cII-gène sérum-albumine complet" sur un fragment EcoRI-HindIII, comme le plasmide "pXL70" et qui porte la substitution RBS "consensus" par celui du gène cII.

On coupe le plasmide "pXL139" décrit précédemment au site unique SalI, entre le promoteur PL et le RBS cII. On digère 20 l'ADN par l'enzyme Bal31, de telle sorte que le site de fin de transcription tR1 en 5' du RBS cII soit digéré puis on ajoute un adaptateur HinDIII et on isole le fragment HinDIII-XbaI contenant le RBS cII amputé de tR1 et les 357 premiers codons du gène de la sérum-albumine humaine. On combine ce fragment HinDIII-XbaI avec 25 d'une part le fragment XbaI-EcoRI du plasmide pXL139 contenant la fin du gène de la sérum-albumine humaine et d'autre part le fragment EcoRI-HinDIII portant le promoteur P_L obtenu à partir du plasmide pUC8- P_L après destruction du site BamHI. On obtient ainsi le plasmide pXL324.

4. Construction d'un plasmide d'expression pour la "pseudo-pro-SAH"

Un fragment d'ADN est construit par hybridation de deux oligonucléotides synthétiques ayant la structure donnée dans la figure 6A. La séquence contient un codon de démarrage "ATG" suivi par les 6 premiers codons du gène cII du bactériophage lambda. Ce fragment possède une extrémité cohésive de type *Hin*III et une autre extrémité cohésive de type *Sall*. Ce fragment synthétique est cloné entre les sites *Hin*III et *Sall* du vecteur M13mp10 (J. Messing, Methods Enzymol., (1984), 101, p.20 et suivantes). Le DNA en forme réplicative purifié à partir de cellules infectées par le bactériophage résultant est utilisé dans l'étape suivante de construction.

Un fragment *Sall*-*Bgl*III de 765 paires de bases provenant du plasmide pXL324 contenant le début du gène (ADNc) codant pour la SAH est cloné dans ce bactériophage recombinant. La souche de *E.coli* JM101 est infectée par ce nouveau bactériophage et le surnageant d'une culture de 5 heures est utilisé comme source de particules phagiques contenant l'ADN simple brin caractéristique des phages filamentaires de type M13. Ce simple brin sert ensuite de matrice pour une mutagénèse dirigée par oligonucléotide permettant de supprimer la séquence comprise entre le sixième codon du gène cII et le premier codon de la SAH mature (GAT) selon les méthodes décrites, par exemple, par J.P. Adelman et coll., DNA (1983), 2, p.183. L'oligonucléotide utilisé dans cette mutagénèse dirigée est décrit dans la figure 6B. Le phage résultant contient le début d'un nouveau gène fusionné. La structure de fragment d'ADN utilisé dans les constructions ultérieures est vérifiée par la méthode de séquençage enzymatique (F. Sanger et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1977), 74, p.5463).

Une reconstruction du gène complet codant pour la fusion "pseudo-pro-SAH" est ensuite effectuée. Un vecteur contenant un gène de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication, un terminateur de transcription et une partie de l'ADNc codant pour la 5 SAH est préparé à partir du plasmide pXL70 en traitant ce plasmide par les enzymes de restriction EcoRI et PvuII. Le fragment de 7200 paires de bases environ est purifié par électrophorèse en gel d'agarose et électroélution. Un fragment de 430 paires de bases contenant le promoteur P_L et le site d'accrochage sur le ribosome 10 (RBS) modifié du gène cII est purifié à partir d'une digestion du plasmide "pXL324" par les enzymes EcoRI et NdeI par électrophorèse en gel de polyacrylamide et électroélution. Un fragment NdeI-PvuII de 200 paires de bases contenant le début du gène hybride cII-SAH est purifié à partir de la forme réplicative du bactériophage M13 15 recombiné modifié par mutagénèse in vitro décrite ci-dessus. Une réaction de ligation à trois partenaires a été effectuée. Le plasmide résultant est appelé "pXL462" (figure 7).

Le plasmide "pXL462" a été introduit dans la souche G819 par transformation. Cette souche est dérivée de la souche E103S 20 (L. SIMON, Waksman Institute for Microbiology, Rutgers-The State University, Piscataway, N.J., USA) par transformation avec le plasmide pRK248clts (H-U. Bernard et coll., Gene (1979), p.59 et suivantes). Ce plasmide est compatible avec "pXL462" et porte le gène cI du bactériophage lambda qui code pour un répresseur thermosensible 25 du promoteur P_L . Ce répresseur devient en effet inactif au-dessus de 38,5°C. La souche obtenue porte le numéro G1398.

5 A partir du plasmide pXL462, d'autres plasmides ont été construits où le promoteur P_L contenu sur un fragment de restriction EcoRI-HinDIII a été remplacé par différents promoteurs bactériens inductibles. La construction de ces plasmides a utilisé le site XbaI unique de pXL462 et une réaction de ligation à trois partenaires du type de celle décrite ci-dessus (voir figure 7). La présente invention ne dépendant pas du type de promoteur bactérien utilisé, seul le cas du plasmide pXL462 portant le promoteur P_L sera évoqué dans ce qui suit.

10 B. PRODUCTION DE cII-SAH PAR VOIE MICROBIOLOGIQUE

1. Culture et Induction

15 A partir d'un réisolement de la souche G1398 sur une boîte de Pétri gélosée à base de milieu LB contenant 50 microgrammes/ml d'ampicilline (LBAp) préalablement incubée à 30°C, une préculture est diluée 100 fois dans le même milieu et la culture est incubée à 30°C avec agitation. Lorsque la densité optique lue à 610 nanomètres atteint 1,0 la culture est alors portée à 42°C pendant 90 minutes avec agitation.

20 2. Sonication, récupération de la cII-SAH

25 Le culte cellulaire collecté par centrifugation est ressuspended dans 1/30 de volumes de PBS (0,2 g/l KCl, 0,2 g/l K_2HPO_4 , 8 g/l NaCl et 1,25 g/l Na_2HPO_4). Après incubation pendant 15 minutes à une température voisine de 20°C en présence de lysozyme de blanc d'oeuf à 1 mg/ml, la sonication des bactéries est effectuée à 0°C, par exemple, avec un sonicateur Branson (Modèle B30) en mode continu pendant deux fois six minutes avec refroidissement. La fraction insoluble est collectée par centrifugation à 12000 g à 4°C pendant 15 minutes puis lavée par du PBS et séchée sous vide à 30°C pendant 15 minutes.

3. Dénaturation, réduction et renaturation

Le culot de sonication contenant les produits insolubles provenant de 1 litre de culture est repris dans 4 ml de solution dénaturante et réductrice (6M guanidine-HCl, 0,1M KH_2PO_4 pH 7,5, 0,1M β -mercaptoéthanol). La suspension ainsi obtenue est agitée doucement en tube fermé à 4°C pendant 16 heures. Une solution presque limpide est alors obtenue. Un léger précipité insoluble est éliminé par centrifugation. Une dilution au 1/100 du surnageant est effectuée dans une solution de renaturation (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) et ce mélange est laissé à 4°C pendant 24 heures. La solution est ensuite centrifugée pour éliminer une opalescence blanchâtre. Le surnageant obtenu est concentré environ 100 fois par ultrafiltration (membrane à "cut-off" de 30.000 daltons ; par exemple en utilisant les unités d'ultrafiltration à usage unique Millipore CS-30), de nouveau clarifié par centrifugation puis dialysé contre un tampon phosphate (Na) 20 mM pH 7,5. La protéine fusion cII-SAH (pseudo-pro-SAH) ainsi obtenue est homogène à plus de 90 % d'après une analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS.

20 4. Conversion de la cII-SAH en SAH mature

Une solution de trypsine (préparée par exemple à partir de trypsine lyophilisée pour usage analytique commercialisée par Boehringer Mannheim) est préparée dans la solution de réaction. La cII-SAH est traitée à une concentration, par exemple de l'ordre de 1 mg/ml, avec une quantité de trypsine comprise entre 1/5000 et 1/1000 (rapport massique à la SAH) à 37°C pendant 30 à 60 minutes dans un tampon phosphate (Na) 50 mM pH 7,5, 50 μM CaCl_2 .

5. Vérification de la coupure

Il est possible de suivre la réaction de conversion par la trypsine sur un gel de polyacrylamide non dénaturant (figure 8). A cause de la présence de plusieurs acides aminés chargés positivement 5 dans l'hexapeptide N-terminal, la migration électrophorétique de la cII-SAH est plus lente sur ce type de gel que celle de la SAH native. Sur la figure 4, on peut voir que la SAH commerciale n'est pas modifiée de façon appréciable par la trypsine dans la gamme de concentrations utilisée. Par contre, la cII-SAH est convertie par 10 l'action de la trypsine en une molécule qui co-migre avec la SAH commerciale. La séquence N-terminale de cette protéine modifiée par la trypsine a été examinée par dégradation de Edman et les résultats obtenus confirment bien que le site de protéolyse est situé après le dipeptide Lys-Arg, à la fin de la partie cII de la protéine hybride. 15 La protéine ainsi générée possède l'acide aspartique comme résidu N-terminal ; elle est donc identique à la SAH d'origine naturelle.

Dans la demande de brevet européen EP 86400618.4, publiée 20 sous le numéro 200590, au nom de la demanderesse, a été décrite la construction du plasmide "pXL288". Après introduction dans une souche appropriée d'E.coli, ce plasmide (figure 9) permet l'expression à haut niveau d'une protéine hybride, non maturée in vivo, constituée par la fusion entre le peptide signal de la pénicilline G 25 amidase (PAM) (EC 3.5.1.11 ; pénicilline aminohydrolase) de E.coli et la SAH mature.

Le plasmide "pXL288" est caractérisé en ce qu'il contient le promoteur P_{trp} de l'opéron tryptophane de E.coli en amont du promoteur de la PAM, le site de fixation des ribosomes du gène de la PAM, le codon d'initiation ATG et les nucléotides du peptide signal de la PAM fusionnés avec le gène de structure de la SAH.

L'extrémité N-terminale du peptide leader de la PAM contient une séquence de 5 acides aminés basiques. Cette basicité constitue une des caractéristiques générales d'un peptide signal de sécrétion (M.E.E. Watson, Nucl. Acids. Res., 12, p. 5145 et suivan-

tes). Il a maintenant été trouvé que les 6 premiers acides aminés de ce peptide signal (Met Lys Asn Arg Asn Arg-, "PAM 1") peuvent jouer le rôle de séquence "pseudo-pro".

Dans ce but, les nucléotides correspondant aux acides 5 aminés 7 à 26 du peptide leader de la PAM ont été supprimés afin de fusionner exactement la séquence "PAM1" à la séquence de la SAH mature en utilisant la technique de suppression dirigée par oligonucléotide décrite précédemment (figure 9). L'oligonucléotide permettant de réaliser cette suppression est représenté par la figure 11A. 10 La séquence modifiée est ensuite substituée dans le plasmide "pXL288" pour donner le plasmide "pXL641" dont la structure est la suivante : "EcoRI-Ptrp-SalI-[Promoteur PAM-RBS PAM-séquence nucléotidique codant pour PAM1]-gène SAH".

15 Deux dérivés de la séquence "PAM1" sont construits par mutagénèse dirigée par oligonucléotide, après sous-clonage dans le bactériophage M13mp18amIV, selon la méthode décrite par P. CARTER et coll., Nucl. Acids Res., 1985, 13, p.4431 et suivantes. Les oligonucléotides permettant de réaliser cette mutagénèse sont représentés dans les figures 11B et 11C. Après reconstruction, deux plasmides 20 analogues au plasmide "pXL641" contenant les séquences codant pour "PAM2" (Met Lys Asn Arg Lys Arg- ; plasmide "pXL740") et "PAM3" (Met Lys Lys Arg Lys Arg- ; plasmide "pXL741") sont obtenus (figure 10).

Après introduction des plasmides "pXL641", "pXL740" et 25 "pXL741" dans une souche appropriée de E.coli telle que E.coli 54125 (Collection de l'Institut Pasteur), on obtient des souches produisant respectivement les protéines hybrides PAM1-SAH, PAM2-SAH et PAM3-SAH à des taux de l'ordre de 5 à 10 mg/l de milieu pour une absorbance de 1 à 610 nm en opérant dans les conditions décrites dans la demande de brevet européen EP 86400618.4 (200590).

30 La protéine hybride se trouve dans la fraction insoluble du lysat cellulaire et peut être renaturée et partiellement purifiée selon les méthodes décrites précédemment. Chaque protéine hybride obtenue après renaturation peut être convertie en SAH mature par digestion ménagée au moyen d'une concentration optimisée de trypsine 35 dans les conditions décrites précédemment.

0236210

23

Conformément aux dispositions du Traité de Budapest, ont été déposés au CBS à Baarn (Pays-Bas) le 3 février 1987 :

- Un échantillon du microorganisme E.coli E103S (pRK 248 cl^{ts}) contenant le plasmide pXL 462 (souche G-1398) sous le numéro 5 CBS 143-87.
- Un échantillon du microorganisme E.coli B contenant le plasmide pXL 641 (souche G-2083) sous le numéro CBS 144-87.
- Un échantillon du microorganisme E.coli B contenant le plasmide pXL 740 (souche G-2146) sous le numéro CBS 145-87.
- 10 - Un échantillon du microorganisme E.coli B contenant le plasmide pXL 741 (souche G-2147) sous le numéro CBS 146-87.

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation d'une protéine hybride contenant une extension peptidique N-terminale hydrophile terminée par un site préférentiel de coupure par la trypsiné fusionnée avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature caractérisé en ce que 5 l'on cultive une souche d'E.coli capable d'assurer le maintien d'un plasmide contenant la séquence nucléotidique codant pour l'extension peptidique N-terminale fusionnée à la séquence nucléotidique codant pour la sérum-albumine humaine mature dont l'expression est contrôlée par un promoteur bactérien inductible.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les codons codant pour l'extension peptidique N-terminale sont choisis parmi les sept premiers codons du gène cII du bactériophage lambda et les six premiers codons du gène de la pénicilline amidase éventuellement transformés par mutagénèse dirigée.
- 15 3. Procédé de préparation d'une protéine hybride contenant une extension peptidique N-terminale fusionnée avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature caractérisé en ce que l'on convertit la molécule dénaturée et insoluble obtenue selon 20 l'une des revendications 1 ou 2 en une molécule renaturée et soluble en utilisant une méthode de dénaturation et renaturation permettant un réarrangement des structures secondaire et tertiaire de la chaîne polypeptidique.
- 25 4. Procédé selon l'une des revendications 1, 2 ou 3 caractérisé en ce que la protéine hybride est convertie par la trypsiné en une protéine identique en structure primaire à la sérum-albumine humaine mature.

5. Le plasmide "pXL462" caractérisé en ce qu'il contient le promoteur P_L , le site de fixation des ribosomes du gène cII privé du signal de terminaison de la transcription tRL, le codon d'initiation ATG et les six premiers codons du gène cII fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

6. La protéine hybride comprenant à l'extrémité N-terminale les sept premiers acides aminés de la protéine cII du bactériophage lambda, (Met)-Val-Arg-Ala-Asn-Lys-Arg, fusionnés avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E.coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL462".

15 7. Le plasmide "pXL641" caractérisé en ce qu'il contient le promoteur Ptrp suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons du gène de la pénicilline amidase fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

20 8. La protéine hybride comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés de la pénicilline amidase, Met-Lys-Asn-Arg-Asn-Arg, fusionnés avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E.coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL641".

25 9. Le plasmide "pXL740" caractérisé en ce qu'il contient le promoteur Ptrp suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons d'un gène de la pénicilline amidase modifié par mutagénèse dirigée fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

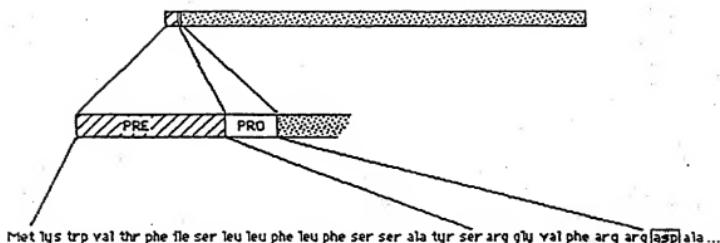
30 10. La protéine hybride comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés d'une pénicilline amidase N-terminale modifiée par mutagénèse dirigée, Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg, fusionnés à la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E.coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL740".

11. Le plasmide "pXL741" caractérisé en ce qu'il contient le promoteur *Ptrp* suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons d'un gène de la pénicilline amidase modifié 5 par mutagénèse dirigée fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

12. La protéine hybride comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés d'une pénicilline amidase modifiée par mutagénèse dirigée, Met-Lys-Arg-Lys-Arg, fusionnés avec 10 la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'*E.coli* capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL741".

0236210

Pl. 1/27



1

STRUCTURE DE LA "PREPRO-SAH"

FIGURE 1

Carte de restriction du gène de l'albumine humaine et position des insertions

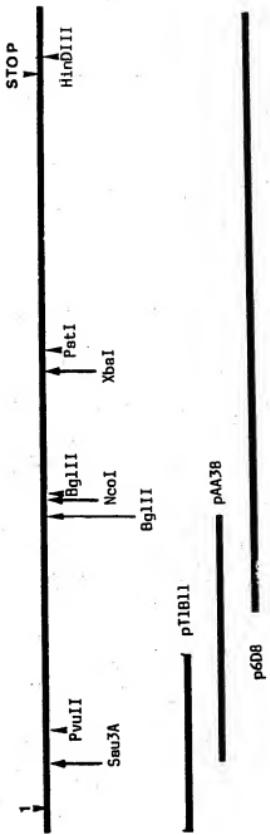


Figure 2

Le chiffre 1 correspond au 1er acide aminé de l'albumine humaine.

L'insertion du plasmide "pT1B11" s'étend au-delà de l'extrémité 5', vers la séquence de la proalbumine.

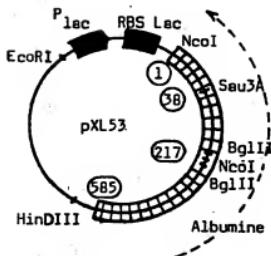
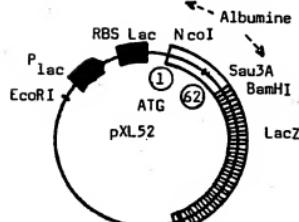
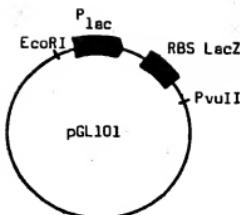
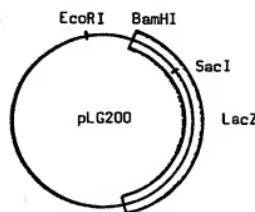
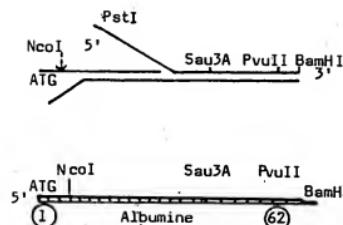
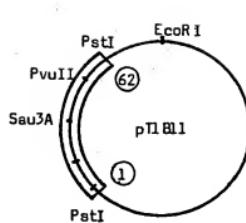


Figure 3

0236210

Pl. IV/27

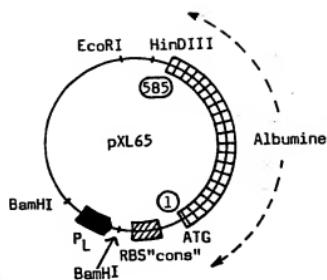
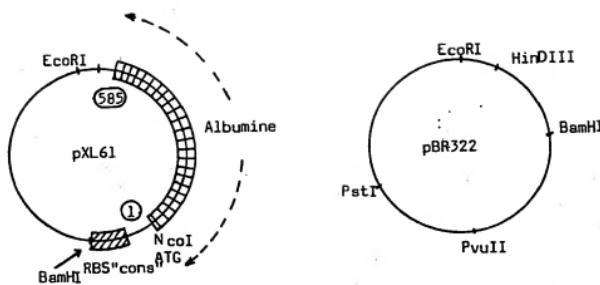


Figure 3

P1. V/27

0236210

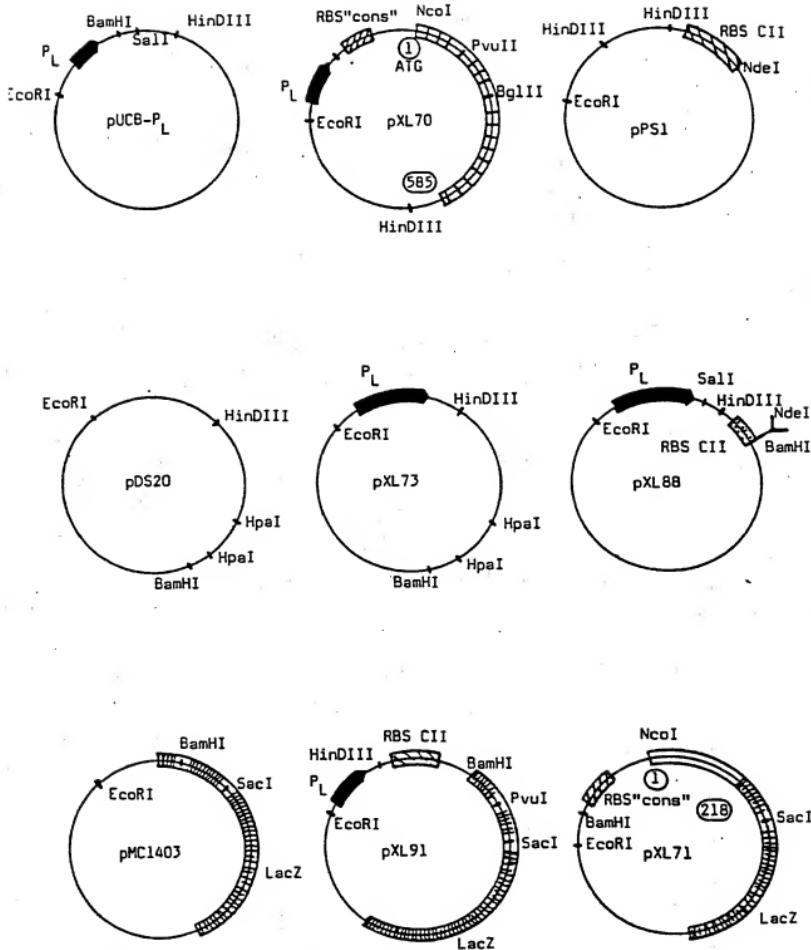


Figure 3

0236210

P1. VI/27

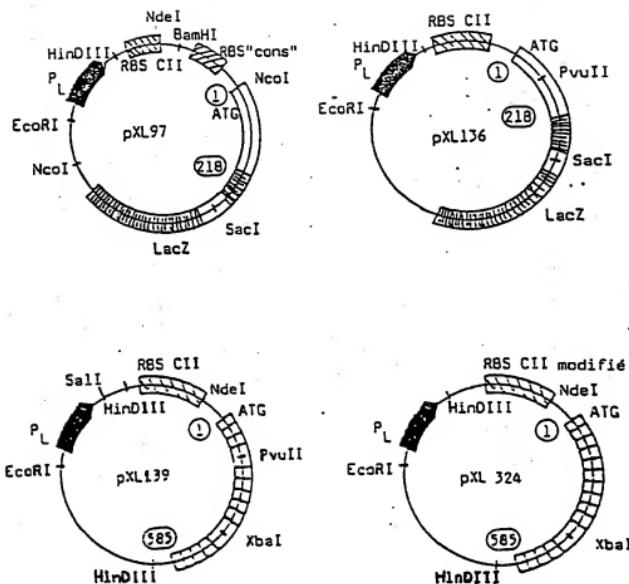


FIGURE 3

0236210

Pl. VII/27

SEQUENCE DE L'INSERTION DE pXL53

10 20 30 40 50 60 70 80
EcoRI
GAATTCCTCACTCATTAGCCACCCAGGCCTTTACACATTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGGAAATTGTGAGGG
CTTAAAGGAGTGAGTAACTCGTGGGGTCCGGAAATGTCTAAATAACGAAGCCGAGGATACACACACCTTAACACTCGCC

90 100 110 ↓ 120 130 140 150 160
ATACGATTTCACACAGGAACAACTGGATGCAACAGAGATGGTTGGCTCATCTGGTTTAAAGATTGGGAGA
TATTGTTAAACTGTCTTGTCTTAGGTACCTACGTGTCTCACTCCAACCSAGTAGECAAAATTCTAAACCTCT

170 180 190 200 210 220 230 240
AGAAAATTCAAAAGCCTGGTGTGATTGGCTTGGCTCAGTATCTCAGCAGTGTCCATTGAAAGATCATGTAATTAG
TCTTTAAAGTTGGAAACCAACATAACGGAAACGAGTCATAAAGTCACAGGTAACTTCTAGTACATTAACT

Figure 4

0236210

Pl. VIII/27

	240	270	280	290	300	310	320
240	240	270	280	290	300	310	320

卷之三

5'-GATTTGAAAGTAACTGAAATGTTGCTGATGAGTCAGTGAAGAAATGCTTAACTCTTACACTGTCACATTGAAAGTATGGAA
ACTACTCTATGACTTAACGTTTGTACACAACTACTCTATGACTTAACACTGTCACATTGAAAGTATGGAA

275 210 370 380 320 7 400

330 340 350

TTGGAGACAAATTATGCCAGTGTCAACTCTTGTGAAACCTATGGTAAATGCTGACTCTGTAAACAGAAC
AAACCTCTGTTAAATAGCTGTCACAGTTGAAAGCACTTGGATACCATTTACCGACTGAGCACACGTTTGTCTGG

卷之三

430 120 110

TGAGAAATGAATGCTTGGAAACACAAAGATGAAATCRAAATCTCCCCGATTEGTGACCAAGGTTAGTGA
ACTLCTTACTAGAGAACGTTGTGTTCTACTTTAGGTTAGGGGCTAACACTCTGGCTCCAACTACACT

2000 510 520 530 540 550 560

ACTA
SOC
OEC

TCTGCACTGCTTCTGACAATGAAAGACATTGGAAAATACTATGAAAGCTCTGAAACTTAACTTAAACGGTCTCTGTAGGAATGAAA
ACACGTGACGAAAAGACTGTACTTCTCTGAAACACTTTTATGAAATACTTAACTTAAACGGTCTCTGTAGGAATGAAA

Figure 4 (suite)

0236210

570 580 590 600 610 620 630 640
 TATGCCCGGAACTCCTTTGCTAAAGGTATAAGCTGCTTTACAGAATGTTGCCAAGCTGCTGAAAGCAGC
 ATACGGGGCTGAGGAAAGAACGATTTCGAGAAAATGCTTACAAACGGTTGAGGACTATTCTGCTCG

 650 660 670 680 690 700 710 720
 CTGTTGCCAAAGCTCGTGAACCTGGGATGAAGGGAAGGGCTCTGCTGCCAAACAGAGAACCTAACAGTGCTGCACTC
 GATGACACGG1TTCGAGCTACTTGAAGCCCTACTTCCGAAGCAGCGTTGCTCTGAGITCACGGTCAG

 730 740 750 760 770 780 790 800
 TCCAAAGGTTGAGAAGAGCTTCAAGGATGGGAGTAGCTCGGCTTGAGCCAGAGATTCTCCAAAGCTGAGTTGCA
 AGGTGTTAAACCTCTCTCAAAGTTCGTAACCGTCATCGAGGGACTCGGTCTCTAAAGGCTTTCGACTAAACGT

 810 820 830 840 850 860 870 880
 GAAGTTCCAGTTACTGACAAATTGACAAAGTCCACAGGAAATCTGCCATGGAGACTGCTTGAATGIGCTGATGA
 CTTCAAAGGTTCAATCACCTGCTCTAGAAATGGTTTCAAGGTGCGCTTACGACGGTACCTCTAGACGAACTTACAGGACT

Figure 4 (suite)

0236210

890 900 910 920 930 940 950 960
CAGGGGACCTGCCAAGTATACTGTGAAATCAAGATTGATCTCCAGTAACIGAATGGAAATGCTGTGAAAAACCTC
GTCGGCCTGGAACGGTTCAATAGACACTTTAGTTCAAGCTTACAGTCATTGACTTCCTTACGACACTTTGGAG

970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
TGTTGAAATACTCCACTGATGCCGAAGTGGAAAATGATGAGATGCTGTGACTTGCTTCATTGGGCTGAAATT
ACACCTTTAGGGTCACGTACGGCTCACCTTTACTACTTGAGGACTGAACGGAAATTAATCGGGACTGAAAG

1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
GTTGAAACTAGGATGTTGCAAAAACATGCTGGCAAGGGATGCTTCTGGCAATGTTTGTATGAATATGCAAG
CAACTTCATTCCTACAAAACGTTTGTATAGACTCCGGTTCTACAGAAAGAACCCGTACAAAAACATACTTATACGTC

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
AAGGCATCCGATTACTCTGTCGACTGCTGACTGCTGAGACTTGCCTAAAGAGATATGAAACACACTAGAAAGTGCCTGGCG
TTCCGTTAGGACTAATGAGCAGCAATGACGGACTCTGAACGGTTCTGATACCTTGTGAGATCTTCACGACACGGC

Figure 4 (suite)

0236210

	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880
Population	1,120	1,220	1,320	1,420	1,520	1,620	1,720	1,820
Area (sq. miles)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Rate per square mile	1,120	1,220	1,320	1,420	1,520	1,620	1,720	1,820

CTGCAAGATCTCATGATGCTATGCCAAAGTGTGATGAATTAAACCTCTATGGAAGGCCCTCAGATTAACTAAAGACGCTAGACTACGATAGCTTCAAGAGTACTTAATTGGAGATAACCTTCTGGAGTCTAAATTAGTT

Year	Population	Area (sq km)	Population Density (per sq km)
1990	121.6	122.6	1,000
1995	123.0	123.0	1,000
2000	124.4	124.4	1,000
2005	125.8	125.8	1,000
2010	127.2	127.2	1,000
2015	128.6	128.6	1,000
2020	129.9	129.9	1,000
2025	131.2	131.2	1,000
2030	132.5	132.5	1,000
2035	133.8	133.8	1,000
2040	135.1	135.1	1,000
2045	136.4	136.4	1,000
2050	137.7	137.7	1,000
2055	139.0	139.0	1,000
2060	140.3	140.3	1,000
2065	141.6	141.6	1,000
2070	142.9	142.9	1,000
2075	144.2	144.2	1,000
2080	145.5	145.5	1,000
2085	146.8	146.8	1,000
2090	148.1	148.1	1,000
2095	149.4	149.4	1,000
2100	150.7	150.7	1,000

1440 1439 1438 1437 1436 1435 1434 1433 1432 1431 1430 1429 1428 1427 1426 1425 1424 1423 1422 1421 1420 1419 1418 1417 1416 1415 1414 1413 1412 1411 1410 1409 1408 1407 1406 1405 1404 1403 1402 1401 1400 1399 1398 1397 1396 1395 1394 1393 1392 1391 1390 1389 1388 1387 1386 1385 1384 1383 1382 1381 1380 1379 1378 1377 1376 1375 1374 1373 1372 1371 1370 1369 1368 1367 1366 1365 1364 1363 1362 1361 1360 1359 1358 1357 1356 1355 1354 1353 1352 1351 1350 1349 1348 1347 1346 1345 1344 1343 1342 1341 1340 1339 1338 1337 1336 1335 1334 1333 1332 1331 1330 1329 1328 1327 1326 1325 1324 1323 1322 1321 1320 1319 1318 1317 1316 1315 1314 1313 1312 1311 1310 1309 1308 1307 1306 1305 1304 1303 1302 1301 1300 1299 1298 1297 1296 1295 1294 1293 1292 1291 1290 1289 1288 1287 1286 1285 1284 1283 1282 1281 1280 1279 1278 1277 1276 1275 1274 1273 1272 1271 1270 1269 1268 1267 1266 1265 1264 1263 1262 1261 1260 1259 1258 1257 1256 1255 1254 1253 1252 1251 1250 1249 1248 1247 1246 1245 1244 1243 1242 1241 1240 1239 1238 1237 1236 1235 1234 1233 1232 1231 1230 1229 1228 1227 1226 1225 1224 1223 1222 1221 1220 1219 1218 1217 1216 1215 1214 1213 1212 1211 1210 1209 1208 1207 1206 1205 1204 1203 1202 1201 1200 1199 1198 1197 1196 1195 1194 1193 1192 1191 1190 1189 1188 1187 1186 1185 1184 1183 1182 1181 1180 1179 1178 1177 1176 1175 1174 1173 1172 1171 1170 1169 1168 1167 1166 1165 1164 1163 1162 1161 1160 1159 1158 1157 1156 1155 1154 1153 1152 1151 1150 1149 1148 1147 1146 1145 1144 1143 1142 1141 1140 1139 1138 1137 1136 1135 1134 1133 1132 1131 1130 1129 1128 1127 1126 1125 1124 1123 1122 1121 1120 1119 1118 1117 1116 1115 1114 1113 1112 1111 1110 1109 1108 1107 1106 1105 1104 1103 1102 1101 1100 1099 1098 1097 1096 1095 1094 1093 1092 1091 1090 1089 1088 1087 1086 1085 1084 1083 1082 1081 1080 1079 1078 1077 1076 1075 1074 1073 1072 1071 1070 1069 1068 1067 1066 1065 1064 1063 1062 1061 1060 1059 1058 1057 1056 1055 1054 1053 1052 1051 1050 1049 1048 1047 1046 1045 1044 1043 1042 1041 1040 1039 1038 1037 1036 1035 1034 1033 1032 1031 1030 1029 1028 1027 1026 1025 1024 1023 1022 1021 1020 1019 1018 1017 1016 1015 1014 1013 1012 1011 1010 1009 1008 1007 1006 1005 1004 1003 1002 1001 1000 999 998 997 996 995 994 993 992 991 990 989 988 987 986 985 984 983 982 981 980 979 978 977 976 975 974 973 972 971 970 969 968 967 966 965 964 963 962 961 960 959 958 957 956 955 954 953 952 951 950 949 948 947 946 945 944 943 942 941 940 939 938 937 936 935 934 933 932 931 930 929 928 927 926 925 924 923 922 921 920 919 918 917 916 915 914 913 912 911 910 909 908 907 906 905 904 903 902 901 900 899 898 897 896 895 894 893 892 891 890 889 888 887 886 885 884 883 882 881 880 879 878 877 876 875 874 873 872 871 870 869 868 867 866 865 864 863 862 861 860 859 858 857 856 855 854 853 852 851 850 849 848 847 846 845 844 843 842 841 840 839 838 837 836 835 834 833 832 831 830 829 828 827 826 825 824 823 822 821 820 819 818 817 816 815 814 813 812 811 810 809 808 807 806 805 804 803 802 801 800 799 798 797 796 795 794 793 792 791 790 789 788 787 786 785 784 783 782 781 780 779 778 777 776 775 774 773 772 771 770 769 768 767 766 765 764 763 762 761 760 759 758 757 756 755 754 753 752 751 750 749 748 747 746 745 744 743 742 741 740 739 738 737 736 735 734 733 732 731 730 729 728 727 726 725 724 723 722 721 720 719 718 717 716 715 714 713 712 711 710 709 708 707 706 705 704 703 702 701 700 699 698 697 696 695 694 693 692 691 690 689 688 687 686 685 684 683 682 681 680 679 678 677 676 675 674 673 672 671 670 669 668 667 666 665 664 663 662 661 660 659 658 657 656 655 654 653 652 651 650 649 648 647 646 645 644 643 642 641 640 639 638 637 636 635 634 633 632 631 630 629 628 627 626 625 624 623 622 621 620 619 618 617 616 615 614 613 612 611 610 609 608 607 606 605 604 603 602 601 600 599 598 597 596 595 594 593 592 591 590 589 588 587 586 585 584 583 582 581 580 579 578 577 576 575 574 573 572 571 570 569 568 567 566 565 564 563 562 561 560 559 558 557 556 555 554 553 552 551 550 549 548 547 546 545 544 543 542 541 540 539 538 537 536 535 534 533 532 531 530 529 528 527 526 525 524 523 522 521 520 519 518 517 516 515 514 513 512 511 510 509 508 507 506 505 504 503 502 501 500 499 498 497 496 495 494 493 492 491 490 489 488 487 486 485 484 483 482 481 480 479 478 477 476 475 474 473 472 471 470 469 468 467 466 465 464 463 462 461 460 459 458 457 456 455 454 453 452 451 450 449 448 447 446 445 444 443 442 441 440 439 438 437 436 435 434 433 432 431 430 429 428 427 426 425 424 423 422 421 420 419 418 417 416 415 414 413 412 411 410 409 408 407 406 405 404 403 402 401 400 399 398 397 396 395 394 393 392 391 390 389 388 387 386 385 384 383 382 381 380 379 378 377 376 375 374 373 372 371 370 369 368 367 366 365 364 363 362 361 360 359 358 357 356 355 354 353 352 351 350 349 348 347 346 345 344 343 342 341 340 339 338 337 336 335 334 333 332 331 330 329 328 327 326 325 324 323 322 321 320 319 318 317 316 315 314 313 312 311 310 309 308 307 306 305 304 303 302 301 300 299 298 297 296 295 294 293 292 291 290 289 288 287 286 285 284 283 282 281 280 279 278 277 276 275 274 273 272 271 270 269 268 267 266 265 264 263 262 261 260 259 258 257 256 255 254 253 252 251 250 249 248 247 246 245 244 243 242 241 240 239 238 237 236 235 234 233 232 231 230 229 228 227 226 225 224 223 222 221 220 219 218 217 216 215 214 213 212 211 210 209 208 207 206 205 204 203 202 201 200 199 198 197 196 195 194 193 192 191 190 189 188 187 186 185 184 183 182 181 180 179 178 177 176 175 174 173 172 171 170 169 168 167 166 165 164 163 162 161 160 159 158 157 156 155 154 153 152 151 150 149 148 147 146 145 144 143 142 141 140 139 138 137 136 135 134 133 132 131 130 129 128 127 126 125 124 123 122 121 120 119 118 117 116 115 114 113 112 111 110 109 108 107 106 105 104 103 102 101 100 99 98 97 96 95 94 93 92 91 90 89 88 87 86 85 84 83 82 81 80 79 78 77 76 75 74 73 72 71 70 69 68 67 66 65 64 63 62 61 60 59 58 57 56 55 54 53 52 51 50 49 48 47 46 45 44 43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

CCAAATGTCAACTCAACTCTGTAGAGGTCTCAAGAACCTAGAAAAGTGGCAAAAGTGTAAACATCTGAA,
GGTTACAGTTAGGTGAGAACCTCTCAGAGTCTTACCGGTGTTACAAACATTGTAGGACTTC

1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520
 CAAAAAGAATGCCCTGTCCAGAAGGTTATCTATCCGTGGTCTGAACCAAGTTATGTTGATGAGAAACGCCAGTA
 GTTTCTTACGGACACCTCTGTATAGATAGGGACCAAGGACTGGCAATTACACACAACTACTCTTGGTCAT

Figure 4 (suite)

0236210

1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
 AGT GAC AGA GCT ACC AAAT GCT GCA AGA AAAT CCT GGTAAC AGGGACAT GCT TTTAGCTCTGGAAAGTCGATGAAAC
 TCACTGTCCTACGGTTAACGAGTGTCTAGAACCCACTGTCGCTTAAAGAAC

 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ATACGTTCCAAAGAGCTTTAACGCTGAAACATTACCTTCATGGAGATAATGCAACATTTCTGAGAAGGAGAGAA
 TATGCAAGGGTTCTCAAATTACGACTTTGTAAGTGGAAAGTACGCTATATACTCTGAAAGACTCTCCCTCTCTGTT

 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760
 TCAAGAAACAACACTGCACTTTGAGCTTGTGAAACACAAGCCAAAGGCAACAAAGACAACTGAAAGCTGTATGGAT
 ACTTCTTGTGTTGACACTGAAACACTGAAACACTTGTGTTGGGTCCGTTCTGTTCTGTTGACATTGACAATACCA

 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840
 GATTTGGCAAGCTTTGTAGAAAGTCGCAAGGCTGACATAAGGAAACCTGCTTGGCGAGGAGGGTAAAGAAACTTGT
 CTTAAAGGCTGCAAAACATCTCTTCAAGGACGTTCCGACTGCTATTCCTTGGACGAAACGGCTCCCTTTGNAACA

Figure 4 (suite)

1050 1060 1070 1080 1090 1000 1910 1920
 585 ↓
 TGCTGCAGTCAGCTGGCTTACACATCACATTAAAGCATCTCAGGCCACATCGAGAATAAGAGAAAGAAA
 ACCACGTTCAAGTCAGGAAATCGAAATTCTAGTGAATTCTAGTAAATTTCGTAAGTCGGATGTTACTCTTATTCCTT
 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000
 ATGAAGATCAAAGCTTATTCAATTCTGTTCTCTGGTGTAAAGCCTAACACCCCTGTCTAAACATAATT
 TACTCTAGTTCGAATAAGTAAGACAAAGAAAGAAACACATTTGGTGTGGCACAGATTTGTATTAA
 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
 TCCTTAATCATTAACTATTCTGCTCTCAATTAAATAAAGAATCTAAAGAACCCCC
 AGAAATTAGTAAATTAGTAAACCGAGAAAGAGAACGAACTTAATTATTTACCTTCTAGATTTTGGGG
 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 PetI ↓
 CCCCCCCCCCCCTGAGCAATTAGCAAAACGTTGCCAAACTTAACTGGCAA
 GGGGGGGGGGGGACCTCGTTATCGTTGTTGCAACCGGTTGATAATTGACCGCTT

Figure 4 (suite)

TRADUCTION DU GENE DE L'ALBUMINE HUMAINE DANS pXL53

0236210

Pl. XIV/27

125	140	155	170
ATG GAT GCA CAC AAG AGT GAG GTT GET CAT CCG TTT AAA GAT TGT GCA GAA GAA AAT TTC			
NET ASP ALA IIS LYS SER GLU VAL ALA IIS ARG PHE LYS ASP LYS GLU GLU ASN PHE			
①			
185	200	215	230
AAA GCC TTT GTC TGG ATT GGC TTT GET CAG TAT CTT CAG CAG TGT CCA TTT GAA GAT GAT			
LYS ALA ILE VAL LEU ILE ALA PHE ALA GLU TYR LEU GLA GLN CYS PRO PHE GLU ASP IIS			
245			
260	275	290	
GTA AAA TTA TGT AAT GAA GTC ACT GAA TTT GCA AAA ACA TGT GTT GET GAT GAG TCA GCT			
VAL LYS LEU VAL ASN GLU VAL THR GLU PHE ALA LYS THR CYS VAL ALA ASP GLU SER ALA			
305			
320	335	350	
GAA AAT TGT GAC AAA TCA CTT CAT ACC CTT TTT GGA GAC AAA TTA TGC AAA AAA GTT GCA ACT			
GLU ASN CYS ASP LYS SER LEU IIS THR LEU PHE GLY ASP LYS LEU CYS THR VAL ALA THR			

Figure 5

0236210

Pl. XV/27

365 CTT CGT GAA ACC TAT GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGT GCA AAA CAA GAA CCT GAG AGA AT
380 LEU ARG GLU THR TYR GLY GLU MET ALA ASP CYS CYS ALA LYS GLN GLU PRO GLU ARG ASN
395 410

425 GAA TGC TTC TTG CAA CAC AAA GAT GAC AAT CCA AAT CTC CCC CGA TTG GIG AGA CCC GAG
430 GLU CYS PHE ILE GLN HIS LYS ASP ASP ASN PRO ASN LEU PRO ARG LEU VAL ARG PRO GLU
435 440 445 450 455

485	GAT GIG ATG TGC ACT	GCT TTT CAT GAC AAT GAA GAG ACA TTT TTG AAA AAA TAC TTA	515	530
500	ASP VAL MET CYS THR ALA PHE HIS ASP ASN GLU GLU THR PHE LEU LYS TYR LEU			

545	560	575	591
ATGAAATTGCCAGAGACATCCTTACCTTATGCCCGGAACTCTTTCCTTGGCTTTGCTAAA TYRGLUTIEALAARGARGHISPROTYRALAPROGLULEULEUPHEPHEALAlys			

Figure 5 (suite)

0236210

605 620 635 650
AGG TAT AAA GCT GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GAT AAA GCA GGC TGC CTG TTG
ARG TYR LYS ALA ALA PHE THR GLU CYS CYS GLN ALA ALA ASP LYS ALA ALA CYS LEU LEU

665 680 695 710
CCA AAG CTC GAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCT AAA CAG AGA CTC AAG
PRO LYS LEU ASP GLU LEU ARG ASP GLU GLY LYS ALA SER SER ALA LYS GLN ARG LEU LYS

725 740 755 770
TGT GCC AGT CTC GAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTC GCT CGC CTG
CYS ALA SER LEU GLN LYS PHE GLY GLU ARG ALA PHE LYS ALA TRP ALA VAL ALA ARG LEU

785 800 815 830
AGC CAG AGA TTT CCC AAA GCT GAG TTT GCA GAA GTT TCC AAG TTA GTG ACA GAT CTT ACC
SER GLN ARG PHE PRO LYS ALA GLU PHE ALA GLU VAL SER LYS LEU VAL THR ASP LEU THR

Figure 5 (suite)

0236210

390

```

AAA GTC CAC AGG GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTG CTT GAA TGT GCT GAT GAA GTC
LYS VAL IIS TIR GLU CYS CYS HIS GLY ASP LEU GLU CYS ALA ASP ARG ALA ASP

```

075

AAA GTC CAC AGC GAA TGC TGC CAT GGA GAT CTC CTT GAA TGT GCT
LYS VAL ILE THR GLU CYS CYS HIS GLY ASP LEU LEU GLU CYS ALA

950

93

11

10

208

9

070

四

140

Figure 5 (suite)

0236210

1085	1100	1115	1130
GCT GCA AAG GAT GTC TTC TTG GGC ATG TTT TGT GAA TAT GCA AGA AGG CAA CCT ALA GLU ALA LYS ASP VAL PHE LEU GLY MET PHE LEU TYR GLU TYR ALA ARG ARG HIS PRO			
	1145	1160	1175
GAT TAC TCT GTC GTC CTC AGA CTT GCC AAG ACA TAT GAA ACC ACT CTA GAG AAG ASP TYR SER VAL VAL LEU LEU LEU ARG LEU ALA LYS THR TYR GLU THR LEU GLU LYS			
	1205	1220	1235
TGC TGT GCC GCT GCA GAT CCT CAT GAA TGC TAT GCC AAA GTG TTC GAT GAA TTT AAA CCT CYS CYS ALA ALA ALA ASP PRO HIS GLU CYS TYR ALA LYS VAL PHE ASP GLU PHE LYS PRO			
	1265	1280	1295
CTT ATG GAA GAG CCT CAG AAT TTA ATC AAA CAA AAT TGT GAG CTT TTT GAG CAG CTT GGA LEU MET GLU PRO GLN ASN LEU ILE LYS GLN ASN CYS GLU LEU GLU GLN LEU GLY			1310

Figure 5 (suite)

0236210

Pl. XIX/27

1325

1340

1375

GAG TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAC ACC AAG AAA GTC CCC CAA GTG TCA
GLU TYR LYS PHE GLN ASN ALA LEU LEU VAL ARG TYR THR LYS LYS VAL PRO GLN VAL SER

1355

1400

1465

ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GAA AGC GGC AGC AAA TGT TGT AAA
THR PRO THR LEU VAL GLU VAL SER ARG ASN LEU GLY LYS VAL GLY SER LYS CYS CYS LYS

1370

1415

1475

CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT CTA TCC GTC GTC CTG AAC CAG
HIS PRO GLU ALA LYS ARG MET PRO CYS ALA GLU ASP TYR LEU SER VAL VAL LEU ASN GLN

1390

1430

1505

1520

TAA TGT GTG TTG CAT GAG AAA ACG CCA GTA AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA
LEU CYS VAL LEU HIS GLU LYS THR PRO VAL SER ASP ARG VAL THR LYS CYS CYS THR GLU

Figure 5 (suite)

0236210

1565	1580	1595	TCC TTC GTG AAC AGG CGA CCA TGC TTT TCA GCT CTG GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC BER LEU VAL ASN ARG ARG PRO CYS PHE SER ALA LEU GLU VAL ASP GLU THR TYR VAL PRO	1610
1625	1640	1655	AAA GAG TTT AAT GCT GAA ACA TTC ACC TTC CAT GCA GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG LYS GLU PHE ASN ALA GLU THR PHE HIS ALA ASP ILE CYS THR LEU SER GLU LYS	1670
1685	1700	1715	GAG AGA CAA ATC AAG AAA CAA ACT GCA CTT GTC AAA GAC AAG CCC AAG GCA GLU ARG GLN ILE LYS GLN THR ALA LEU VAL GLU LEU VAL LYS HIS LYS PRO LYS ALA	1730
1745	1760	1775	ACA AAA GAG CAA CTG AAA GCT GTT GAT GAT TTC GCA GCT TTT GTC GAG AAG TGC TGC THR LYS GLN LEU LYS ALA VAL MET ASP ASP PHE ALA ALA PHE VAL GLU LYS CYS CYS	1790

Figure 5 (suite)

0236210

Pl. XXI/27

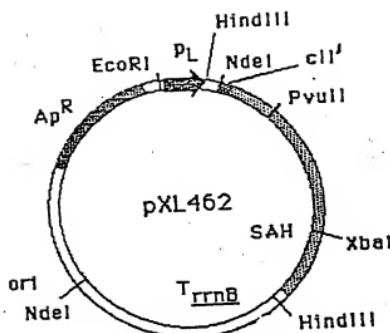
1805	1820	1835	1850
AAG GCT GAC GAT AAG GAA ACC TGC TTT GCC GAG GAG GCT AAA AAA CTT GTT GCT GCA AGT			
LYS ALA ASP ASP LYS GLU THR CYS PHE ALA GLU GLU GLY LYS LEU VAL ALA ALA SER			
1865	1880	1895	
CAA GCT GCC TTA GGC TTA TAA CAT CAC ATT TAA AAG CAT CTC AGC CTA CGA			
GLN ALA ALA ILEU GLY LEU			

585 - STOP

Figure 5 (suite)

0236210

Pl. XXIII/27



PLASMIDE D'EXPRESSION "PSEUDO-PRO-SAH"

Figure 7

0236210

Pl. XXII/27

A. Oligonucléotide codant pour les 6 premiers codons du gène cII

Met Val Arg Ala Asn Lys Arg
5'-AGCTTCATATGGTTCGTCAAAACAGCG-3'
3'-AGTATACCAAGCACGTTGTTGCAGCT-5'

B. Oligonucléotide utilisé pour la Mutagénèse par délétion.

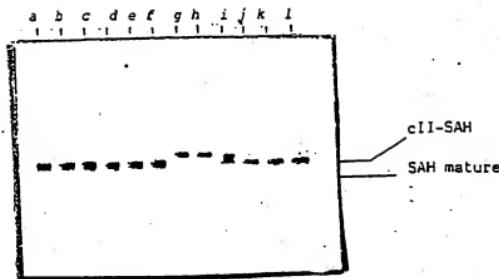
5'-TCGTGCAAACAAACGCGCATGCAACACAAGAGT-3'
cII SAH

OLIGONUCLEOTIDES SYNTHETIQUES
EMPLOYES DANS LA CONSTRUCTION DE
LA cII-SAH

Figure 6

0236210

Pl. XXIV/27



a à f : SAH commerciale (sigma)

g à l : cII-SAH d'origine microbiologique ("pseudo-pro-SAH")

a , g : pas de trypsine

b , h : 0,1 μ g/ml trypsine

c , i : 0,2 μ g/ml trypsine

d , j : 0,4 μ g/ml trypsine

e , k : 0,8 μ g/ml trypsine

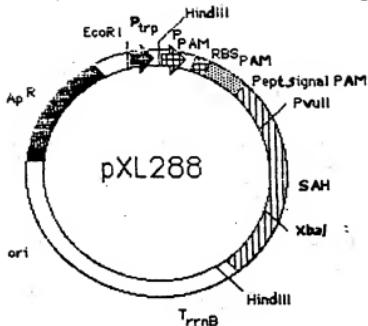
f , l : 1,6 μ g/ml trypsine

[SAH] 1mg/ml, 1 heure d'incubation à 37°C.

analyse : gel de polyacrylamide 10 % non dénaturant.

Conversion de la cII-SAH en SAH mature

Figure 8



Plasmide d'expression de la fusion "Peptide signal PAM-SAH"

EcoRI

...GGATTCCCCTGGTTCACRATTAAATCATCGAACCTAGTTAACCTAGTACGCGCTTGGCTGCAGGT
Promoteur Tryptophane

HindIII

CGACCTGCAGCC~~AGCC~~AGCTTGGCTAGTATCATTACGCTTAAATATACACCTGC~~CG~~AGGGATACAA
Promoteur et Site de fixation des ribosomes de PAM

ATG AAA AAT AGA AAT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG
Met Lys Asn Arg Asn Arg Met Ile Val Asn Cys Val Thr Ala Ser Leu
..... séquence signal de la PAM

..... séquence déletée pour construire

ATG TAT TAT TGG AGC TTA CCT GCA CTG GCT GAT GCA CAC ARG...
Met-Tyr Tyr Trp Ser Leu Pro Ala Leu Ala Asp Ala His Lys...

PAM1-SAH

..... SAH

Séquence des signaux d'expression et du début de la fusion
"Peptide signal PAM-SAH" de pXL288.

Figure 9

0236210

Pl. XXVI/27

A. SEQUENCES DES ACIDES AMINES DES DIFFERENTS SEGMENTS "PSEUDO-PRO"

CII-SAH: MET VAL ARG ALA ASN LYS ARG-ASP
ATG GTT CGT GCA AAC AAA CGC GAT...
aa1SAH

PAM1: MET LYS ASN ARG ASN ARG-ASP
ATG AAA AAT AGA AAT CGT GAT....

PAM2: MET LYS ASN ARG LYS ARG-ASP
ATG AAA AAT AGA AAA CGT GAT....

PAM3: MET LYS LYS ARG LYS ARG-ASP
ATG AAA AAA AGA AAA CGT GAT...

B. MODIFICATIONS EFFECTUEES SUR PAM1

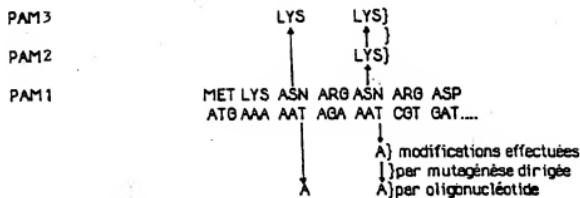


Figure 10

0236210

Pl. XXVII/27

A. OLIGONUCLEOTIDE UTILISE POUR LA MUTAGENÈSE PAR DELETION POUR CONSTRUIRE PAM1 - SAH (pxL641)

5'-ATGAAAAATAGAAATCGTGTGCACACAAGAGTG-3'
PAM SAH

B. OLIGONUCLEOTIDE UTILISE POUR LA MUTAGENESE DIRIGEE POUR CONSTRUIRE PAM2 - SAH (pXL740)

5'CAATGAAAAATAGAAAACGTGATGCACACAAGAGT-3'
 ↑
 nucléotide modifié

C. OLIGONUCLEOTIDE UTILISE POUR LA MUTAGENÈSE DIRIGÉE POUR CONSTRUIRE PAM3 - SAH (pXL741)

Figure 11



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

0236210

Numéro de la demande

EP 87 40 0355

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.4)
X	THE EMBO JOURNAL, vol. 3, no. 6, juin 1984, pages 1429-1434, IRL Press Ltd, Oxford, GB; K.K. STANLEY et al.: "Construction of a new family of high efficiency bacterial expression vectors: identification of cDNA clones coding for human liver proteins" * Page 1430; figure 4 *	1	C 12 N 15/00 C 07 K 13/00
X, P D	EP-A-0 200 590 (GENETICA) * En entier *	1-4, 7- 12	
A	EP-A-0 138 437 (GENEX CORP.) * Exemple 2 *	1-12	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.4)
			C 12 N C 12 P
<p>Le présent rapport de recherche a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur	
LA HAYE	03-06-1987	CUPIDO M.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul	T : théorie ou principe à la base de l'invention		
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie	E : document de brevet antérieur, mais publié à la date du dépôt ou après cette date		
A : arrête-pièce technologique	D : cité dans la demande		
O : divulgation non-déposée	L : cité pour d'autres raisons		
P : document intercalaire	& : membre de la même famille, document correspondant		



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : **0 236 210 B1**

⑫

FASCICULE DE BREVET EUROPEEN

⑯ Date de publication du fascicule du brevet :
23.10.91 Bulletin 91/43

⑯ Int. Cl.⁵ : **C12N 15/14, C12N 15/62,**
C12N 15/70

⑯ Numéro de dépôt : **87400355.1**

⑯ Date de dépôt : **19.02.87**

⑯ Procédé de préparation de la sérum albumine humaine mature.

⑯ Priorité : **21.02.86 FR 8602379**

⑯ Titulaire : **GENETICA**
160 Quai de Polangis
94340 Joinville Le Pont (FR)

⑯ Date de publication de la demande :
09.09.87 Bulletin 87/37

⑯ Inventeur : **Latta, Martine**
297 Rue de Charenton-75
F-75012 Paris (FR)
Inventeur : **Mayaux, Jean-François**
21ter, Boulevard de la République
F-92260 Fontenay aux Roses (FR)
Inventeur : **Sarmientos, Paolo**
Via Mose Bianchi 104
Milano (IT)

⑯ Mention de la délivrance du brevet :
23.10.91 Bulletin 91/43

⑯ Mandataire : **Pillard, Jacques et al**
RHONE-POULENC INTERSERVICES Service
Brevets Pharma 25, Quai Paul Doumer
F-92408 Courbevoie Cédex (FR)

⑯ Etats contractants désignés :
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑯ Documents cités :

EP-A- 0 001 929
EP-A- 0 073 646
EP-A- 0 114 506
EP-A- 0 138 437
EP-A- 0 200 590

THE EMBO JOURNAL, vol. 3, no. 6, juin 1984,
pages 1429-1434, IRL Press Ltd, Oxford, GB;
K.K. STANLEY et al: "Construction of a new
family of high efficiency bacterial expression
vectors: identification of cDNA clones coding
for human liver proteins"

EP 0 236 210 B1

Il est rappelé que : Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (Art. 98(1) Convention sur le brevet européen).

Description

La présente invention concerne un procédé de préparation de le sérum-albumine humaine mature à partir d'une sérum-albumine humaine produite par voie microbiologique sous forme de protéine fusionnée.

Il existe un grand choix d'organismes hôtes, tels que les cellules mammifères modifiées ou les micro-organismes qui peuvent potentiellement être utilisés en vue de la production en quantités importantes de protéines humaines d'une grande valeur thérapeutique.

L'utilisation de cellules mammifères modifiées par les techniques de l'ADN recombinant présente l'avantage de conduire à des produits très proches de ceux d'origine naturelle ; cependant la culture de ces cellules est délicate et ne peut être conduite que dans des volumes limités.

L'emploi de micro-organismes, tels que les bactéries, permet une fabrication à une échelle plus importante mais présente l'inconvénient de conduire à des produits qui diffèrent sensiblement des produits d'origine naturelle. Ainsi les protéines normalement glycosylées chez l'homme ne sont pas, en général, glycosylées par les bactéries [P. Berman et L.A. Laskey, Trends Biochem. Sci., (1985) 10, p.51 et suivantes]. Par ailleurs, les protéines humaines exprimées à haut niveau dans des bactéries telles que *E.coli* acquièrent souvent une conformation non naturelle qui s'accompagne d'une précipitation intracellulaire [R.G. Schoniger et coll., Bio. Technol. (1985), 3, p.151 et suivantes ; J.M. Schoemaker et coll., EMBO J. (1985), 4, p.775 et suivantes]. Enfin, pour qu'un gène puisse s'exprimer dans une bactéries, telle que *E.coli*, il est indispensable de positionner un codon initiateur méthionine devant la séquence codante de la protéine mature. Généralement, ce résidu n'est pas excisé par la méthionyl aminopeptidase de *E.coli* [P.H. Seuberg et coll., 1985, 2, p.37 et suivantes ; J.M. Schoniger et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1981), 81, p.5403]. La protéine obtenue présente donc un acide aminé abnormal comme premier résidu qui peut provoquer l'inhibition stérique d'une activité biologique si le début de la protéine est impliqué dans cette activité. Le résidu peut également présenter un caractère immunogène néfaste à l'administration ultérieure de la protéine.

Il résulte que le choix d'une cellule-hôte dépend de la protéine spécifique que l'on veut obtenir. Dans le cas d'une protéine de valeur marchande élevée et nécessaire en quantité limitée, les cellules mammifères peuvent constituer une source particulièrement bien adaptée. Par contre dans le cas d'un produit de valeur marchande plus faible et nécessaire en quantité importante, de l'ordre de plusieurs dizaines de tonnes, telle que le sérum-albumine humaine (SAH), il paraît indispensable d'utiliser des micro-organismes tout en remédiant aux inconvénients liés à leur emploi.

Lorsque la SAH est exprimée à partir d'une construction génétique du type "Promoteur-Site de démarrage de traduction-ATG-Gène de la SAH mature", la protéine obtenue conserve généralement une méthionine comme résidu N-terminal. Pour éliminer la méthionine N-terminale de protéines hétérologues exprimées chez *E.coli*, plusieurs méthodes peuvent être envisagées, telles que le clivage enzymatique *in vivo*, l'excision protéolytique pendant ou immédiatement après le transport à travers la membrane ou bien des digestions protéolytiques ou chimiques *in vivo*.

Il est connu, en particulier d'après J.P. Waller, J. Mol. Biol., (1963), 7, p.483 et suivantes, que *E.coli* possède une méthionyl aminopeptidase qui excise la méthionine N-terminale d'un certain nombre de protéines. Cependant la spécificité du mécanisme est mal connue et il est supposé que ce mécanisme dépend du ou des résidus suivant la méthionine [V.M. Vogt, J. Biol. Chem. (1970), 245, p.4760 et suivantes ; H.J. George et coll., (1985) DNA, 4, p.273].

Les protéines sécrétées sont généralement initialement synthétisées sous forme d'une préprotéine comportant une "Séquence-signal" qui inclut le premier résidu. Cette séquence subit une excision protéolytique pendant ou immédiatement après le transport à travers la membrane [R. Schekman, Trends Biochem (1985), 10, p.177]. Cependant ce système ne convient généralement pas dans le cas de protéines cytoplasmiques ou hétérologues du fait des problèmes de transport dûs soit à certaines parties de la séquence primaire de la protéine [J. Tommassen et coll., EMBO J. (1985), 4, p.1041] soit à une précipitation intra-cytoplasmique trop rapide de la protéine. Par ailleurs les mécanismes impliqués dans la sécrétion de protéines par les cellules encaryotes, telles que la SAH sécrétée par les cellules hépatiques, sont vraisemblablement assez différents des mécanismes de sécrétion mis en jeu dans des microorganismes tels que les bactéries gram-négatives [N.Wickner et H. Lodish, Science (1985), 230 p.400].

Il a été également proposé d'employer des digestions chimiques ou enzymatiques afin de convertir *in vitro* la protéine synthétisée par la bactérie sous la forme d'une protéine fusionnée. Cette conversion e pour but l'excision spécifique d'une séquence peptidique étrangère à la protéine désirée, située en position N-terminale et contenant la méthionine comme premier résidu. Un exemple simple est celui d'une protéine qui ne possède pas naturellement de résidus méthionine [R.E. Chence et coll., "Peptides : Synthèses-Structure-Fonction", D.H. Rich et E. Gross, ed., Pierce Chem. Co, Rockford, 111., (1981) p.721 et suivantes]. Dans ce cas, un traitement *in vitro* par le bromure de cyanogène permet l'excision de la méthionine N-terminale. Cependant ce

cas ne se présente que très rarement dans le cas de protéines de poids moléculaire élevé.

Certaines protéases, comme la collagénase et le facteur X, reconnaissent une séquence de plusieurs acides aminés, ce qui les rend relativement spécifiques. [K. Nagai et H.C. Thogerson, *Nature* (1984), **309**, p.810 et suivantes ; J. Gercino et D. Bestia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1984), **81**, p.4692 et suivantes]. Une construction génétique permet donc de positionner la séquence reconnue par la protéase en question devant le premier acide aminé de la protéine désirée. Cette protéine fusionnée devient ainsi un substrat de la protéase, le produit principal de la réaction étant la protéine possédant en position N-terminale le même acide aminé que la protéine mature. Cependant, l'inconvénient majeur de cette méthode réside dans le prix de la protéase surtout lorsqu'il s'agit de produire une protéine en grande quantité.

La SAH est synthétisée par les cellules humaines d'abord sous forme de prépro-SAH (figure 1). Une séquence signal de 18 acides aminés est enlevée pendant le transport de la SAH à travers le lumen du réticulum endoplasmique et il reste encore 6 acides aminés à l'extrémité N-terminale (Arg-Gly-Val-Phe-Arg-Arg) qui ne sont pas présents dans le SAH circulante. Selon S.O. Brennan et R.W. Carrel, *Biochim. Biophys. Acta* (1980), **621**, p.83 et suivantes, ce préproptide ne semble jouer aucun rôle dans la sécrétion de la SAH. Il est possible qu'une deuxième protéolyse spécifique s'effectue au niveau de l'appareil de Golgi ou dans la circulation sanguine, les deux résidus arginine formant le site de reconnaissance d'une protéase de spécificité analogue à celle de la trypsin. En effet, un variant, appelé "Albumine Christchurch", dû à une mutation qui transforme le dernier résidu arginine du prépropeptide en glutamine n'est pas converti *in vivo* en albumine mature mais est transformé *in vitro* en Glu-SAH en traitant le prépropeptide par une faible concentration de trypsin. Par ailleurs, la SAH mature sous forme native est résistante à la trypsin dans les même conditions [S.O. Brennan et coll., *Biochim. Biophys. Acta*, (1984) **802**, p.24 et suivantes].

Il a maintenant été trouvé, et c'est ce qui fait l'objet de la présente invention, un procédé permettant de transformer en SAH mature une SAH produite par voie microbiologique sous forme de protéine fusionnée.

Le procédé selon la présente invention consiste :

- 25 - à modifier *in vitro* le gène de structure de la SAH de telle sorte qu'il possède 6 codons supplémentaires codant pour les 6 premiers acides aminés de la protéine cili du bactériophage lambda, puis à lier le gène de structure ainsi modifié à la séquence nucléotidique qui précède naturellement le gène cili dans le génome du bactériophage lambda et à un promoteur qui assure un niveau élevé de transcription,
- 30 - à produire, dans des conditions définies, au moyen d'une bactérie hôte contenant le gène modifié, une protéine hybride ("pseudo-pro-SAH") constituée par les 6 premiers acides aminés du gène cili suivis de la séquence de la SAH mature,
- 35 - à dénaturer et réduire puis renaturer la protéine hybride de façon à obtenir une protéine soluble dont la conformation est semblable à celle de la SAH d'origine naturelle, puis
- à modifier *in vitro*, au moyen de la trypsin, la protéine ainsi obtenue afin d'exciser le pseudo-pro-peptide et obtenir le SAH mature.

Il a également été trouvé que la SAH mature peut être obtenue en utilisant une extension peptidique N-terminale ("pseudo-pro-peptide") dont la séquence diffère de celle des 6 premiers acides aminés de la protéine cili du bactériophage lambda, à condition que cette extension permette une expression suffisante de la protéine fusionnée, présente l'hydrophilicité nécessaire et comporte un site de coupe par la trypsin. Par exemple, le "pseudo-pro-peptide" peut être constitué par les 5 premiers acides aminés de la séquence-signal de la pénicilline-amidase (6, si l'on compte le premier résidu méthionine).

Dans ce qui suit, la signification des termes techniques utilisés en biologie moléculaire est supposée connue (cf. par exemple J. Wilson, "Biologie Moléculaire du Gène", édition française, Interéditions, 1978). Les méthodes couramment employées en biologie moléculaire du gène sont décrites, par exemple, par T. Maniatis et coll., *Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, 1982*. Dans ce qui suit seront décrits successivement la construction, les procédés d'expression du gène, la renaturer et la conversion par la trypsin de la "pseudo-pro-SAH".

A-CONSTRUCTION DU GENE "pseudo-pro-SAH".

50 1. Préparation d'ARN messager de foie

On utilise des cellules hépatiques, obtenues par exemple par biopsie, et on en extrait l'ARN messager selon la méthode décrite par exemple par V. Glisin et coll., *Biochemistry* (1974), **13**, p. 2633 et suivantes ; et par R. Deley et coll., *J. Biol. Chem.* (1977), **252**, p. 8310 et suivantes. On traite la biopsie par une solution de thiocyanate de guanidine 6M, et l'on purifie l'ARN total par plusieurs cycles de précipitation dans l'éthanol à -20°C, centrifugation et redissolution des culots de centrifugation.

On enrichit la préparation en ARN messager par plusieurs cycles de chromatographie d'affinité sur des

colonnes d'oligo (dT)-cellulose, selon la technique décrite par H. Aviv et P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1972), 69, p. 1408 et suivantes. L'ARN messager ainsi isolé, contenant 1 à 2 % de l'ARN total, est conservé en solution aqueuse à -70°C.

On peut déterminer la proportion d'ARN messager spécifique de la sérum-albumine humaine au sein de la population totale (par exemple par traduction *in vitro* d'un aliquot de la solution d'ARN dans des lysats de réticulocytes de lapin). Une méthode consiste à utiliser le lysat de réticulocytes fournis par la société Amersham, suivant le protocole préconisé par ce fournisseur. On peut ainsi déterminer la fraction de protéine néoformée immunoprecipitable par des anticorps anti-albumine au sein de l'ensemble des protéines néoformées. On obtient par exemple une fraction de l'ordre de 6 %.

10 2. Synthèse de cDNA et clonage dans *E.coli*

a. Synthèse du premier brin

15 A partir de la technique de G.N. Buell et coll., J. Biol. Chem. (1978), 253, p. 2471 et suivantes, modifiée, on utilise par exemple 5 µg d'ARN messager total dans un volume final de 50 microlitres d'une solution contenant : 100 mM Tris-HCl pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM DTT, 20 mM KCl, 0,4 mM Na pyrophosphate, 1 mM de chaque nucléotide triphosphate (dNTP), 100 µg/ml de oligo(dT)₁₂₋₁₈, 0,5 U/ml d'inhibiteur de ribonucléases, 50 picomoles de traceur radioactif et 40 unités de Transcriptase réverse (Société Life Science, Inc.).

20 La réaction de transcription réverse de l'ARN messager en ADN complémentaire (ADNc) se poursuit pendant 1 heure à 42°C.

Le taux de synthèse d'ADNc est calculé par mesure du taux d'incorporation du traceur radioactif en molécules acido-précipitables, selon une technique connue.

25 Après 1 heure, on arrête la réaction par addition d'EDTA (20 mM), et l'on détruit l'ARN messager par digestion alcaline dans 50 mM de NaOH, à 42°C, pendant 3 heures.

On sépare l'ADNc néoformé des dNTPs non-incorporés et des produits de dégradation alcaline des ARNs par chromatographie, par exemple, sur une colonne de Sephadex G100 (Pharmacia Fine Chemicals). On obtient 1,5 µg d'ADNc simple brin à partir de 5 µg d'ARN messager total.

30 b. Synthèse du deuxième brin

L'ADNc simple brin est converti en ADN double brin par action du fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I.

35 Les conditions de réaction sont : 100 mM Hepes pH 7, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM DTT, 70 mM KCl, 0,5 mM de chaque dNTP, et 50 unités du fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I (commercialisée par exemple par la Société New England Biolabs Inc.).

La réaction est poursuivie pendant 15 heures, à 15°C, et l'on sépare l'ADN double brin des dNTPs non incorporés à nouveau par chromatographie sur colonne de Sephadex G100.

40 c. Clonage de l'ADN double brin

Pour supprimer les molécules d'ADN simple brin et obtenir un ADN double brin à extrémités franches, on traite les séquences non appariées par la nuclease S₁ selon la technique décrite par A. Efstratiadis et coll., Cell (1976), 7, p. 279 et suivantes. On sépare les ADNc néoformés double brin selon leur taille par centrifugation dans un gradient de saccharose. On utilise généralement un gradient de 5 % - 20 % de saccharose en 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM EDTA, 800 mM NaCl, centrifugé à 210000 g pendant 15 heures, à 20°C, et on effectue un fractionnement du gradient en aliquots après centrifugation.

On contrôle la taille des molécules dans chaque fraction par électrophorèse d'échantillons faite en parallèle avec des étalons d'ADN de tailles connues, et l'on regroupe les fractions contenant un ADN constitué par l'enchaînement de plus de 500 paires de bases.

Pour permettre le clonage de cet ADN on allonge d'abord ses extrémités 3' avec de l'oligo(dC), et on allonge parallèlement les extrémités 3' du site PstI du plasmide vecteur pBR322 avec de l'oligo(dG) selon la technique de F. Rougeon et coll., J. Biol. Chem. (1977), 252, p. 2209 et suivantes.

55 On hybridise alors l'ADN double brin décrit ci-dessus au plasmide vecteur, selon par exemple la technique de L. Villa Komaroff et coll., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978), 75, p. 3727 et suivantes.

On crée une "banque" de clones d'ADNc de foie par transformation de la bactéries *E.coli* avec l'ADN ainsi décrit selon la méthode décrite par M. Mandel et A. Higa, J. Mol. Biol. (1970), 53, p. 154 et suivantes et M.

Dagert et S.D. Erlich., Ganc (1979), 5, p. 23 et suivantes.

d. Repréage des clones d'ADNc albumine

5 On utilise une technique d'hybridation sur colonies à l'aide d'oligonucléotides synthétiques dont les séquences sont déduites de la séquence protéique de l'albumine humaine (B. Meloun et coll., FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Grunstein et D. Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1975), 72, p. 3961 et suivantes ; R.B. Wallace et coll., Nucleic Acids Res. (1981), 9, p. 879 et suivantes).

10 Les clones sont cultivés par séries de 96 sur milieu de Luria contenant 25 µg/ml de tétracycline, en boîtes carrées, directement sur des filtres de nitrocellulose. Après croissance à 37°C puis amplification en présence de 250 µg/ml de chloramphénicol, les colonies sont lysées par la soude puis hybridées avec les oligonucléotides radioactifs an 5' par kinatation, dans une solution contenant : 5 X SSC, 0,5 % NP 40, 100 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé par ébullition et refroidi rapidement dans la glace, 0,5 ng/ml d'oligonucléotide kinase. L'hybridation est effectuée à 37°C pendant 18 heures. On lave ensuite les filtres en 5 X SSC, à 25°C, puis 37°C, puis 45°C et ce pendant quatre fois 15 minutes à chaque étape.

15 Les filtres sont alors exposés sur films Kodak X-OMAT, à -70°C, avec un écran amplificateur pendant 15 à 24 heures. Les clones hybrides avec les sondes sont résolus puis lysés. L'ADN plasmidique est purifié par centrifugation en milieu chlorure de césum-bromure d'éthidium selon une technique connue.

20 On séquencé l'ADN de l'insertion par la technique de Maxam-Gilbert (A. Maxam et W. Gilbert, Methods Enzymol. (1980), 65, p. 499 et suivantes) pour comparer la séquence protéique dérivée de la séquence nucléotidique et celle de la sérum-albumine humaine.

25 On identifie ainsi une série de clones dont les insertions correspondent à l'ensemble du gène de la sérum-albumine humaine.

Dans la figure 2 est représentée la carte de restriction du gène de la sérum-albumine, ainsi que la position de trois des insertions les plus représentatives, désignées par "pT1B11", "pAA38", "p6D8".

e. Incorporation eu grène de structure d'un codon d'initiation (figure 3)

30 a) On digère l'ADN du plasmide "pT1B11" par les enzymes PstI et Pvull, et on isole un fragment d'ADN de 125 paires de bases, correspondant à la séquence de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine (acides aminés n° 1 à 62). On fixe à l'extrémité Pvull une séquence de jonction constituée du site de reconnaissance de l'enzyme BamHI. On obtient ainsi un fragment PstI-BamHI.

35 On prépare d'autre part un oligonucléotide synthétique ayant 21 bases de long, possédant un triplet "ATG" devant les nucléotides codant pour les acides aminés de la sérum-albumine humaine ainsi qu'un site de restriction Ncol, et dont la séquence est la suivante : 5'GAATCCATGGATGCCACAAAG 3'.

On dénature le fragment d'ADN PstI-BamHI, et on l'hybride avec l'oligonucléotide synthétique. L'hybridation se fait par la séquence 5'...GATGCACAAAG 3', l'extrémité 3' du brin d'ADN complémentaire étant désappariée. On digère les extrémités désappariées, puis on polymérisé dans le sens 5'...3' avec le fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I, d'après les techniques de H. Jacobsen et coll., Eur. J. Biochem. (1974), 45, p. 623 et suivantes.

On obtient ainsi un fragment contenant en 5' une extrémité franche, un site Ncol puis le triplet ATG et en 3' un site BamHI.

b) On réalise la ligaison de trois fragments d'ADN :

1) un fragment EcoRI-BamHI du plasmide "pLG200" (L. Guariento et coll., Cell (1980) 20, p. 543 et suivantes) portant un gène de résistance aux antibiotiques, l'origine de réplication et l'extrémité 3' du gène de la β -galactosidase,

45 2) un fragment EcoRI-Pvull du plasmide "pGL101" (G. Lauer et coll., J. Mol. Appl. Genet. (1981), 1, p. 139 et suivantes) portant le promoteur P_{lacZ} et le site de fixation de ribosome (RBS) du gène lacZ d'E.coli,

3) le fragment d'ADN mutagénisé codant pour les 62 premiers acides aminés de l'albumine humaine.

50 On isole un plasmide (pXL52) qui réalise une fusion de l'extrémité 5' du gène de la sérum-albumine humaine avec la gène de la β -galactosidase d'E.coli.

f. Construction du gène complet (figure 3)

55 On digère l'ADN du plasmide "p6D8" par EcoRI, et partiellement par BgIII, selon une technique déjà décrite. On isole le grand fragment EcoRI-BgIII contenant la séquence codant pour les 405 derniers acides aminés de la sérum-albumine humaine puis l'origine de réplication du plasmide et le gène de résistance à la tétracycline.

On digère l'ADN du plasmide "pXL52" décrit ci-dessus par EcoRI et Sau3A, et on isole un fragment conte-

nant 200 paires de bases.

On digère l'ADN du plasmide "pAA38" par Sau3A et on isole un fragment contenant 540 paires de bases.

On ligature les trois fragments (dans l'ordre [pXL52 EcoRI-Sau3A] - [pAA38-Sau3A] - [p608 BgII-EcoRI]) en tirant profit de la compatibilité entre les sites Sau3A et BgII. On obtient un plasmide appelé "pXL53", dont la qualité de la construction est contrôlée par un séquençage complet du fragment compris entre le site EcoRI et le site PstI correspondant à la jonction de l'insertion et du plasmide vecteur.

La séquence nucléotidique complète, ainsi que la séquence protéique dérivée, sont représentées dans les figures 4 et 5.

Les variations observées entre cette séquence et la séquence protéique publiée (B. Meloun et coll, FEBS Letters (1975), 58, p. 134 et suivantes ; M. Dayhoff, Atlas of Protein sequence and structure (1978), 5, supplément 3, p. 306) sont les suivantes :

<u>Position</u>	<u>Meloun et coll.</u>	<u>Sérum-albumine humaine déduite de la séquence de "pXL53"</u>	
15			
131	Glutamine	Acide glutamique	
20	364	Histidine	Alanine
367	Tyrosine	Histidine	
370	Alanine	Tyrosine	
381	Valine	Méthionine	
25	464	Acide glutamique	Histidine
465	Histidine	Acide glutamique	
501	Glutamine	Acide glutamique	

30 3. Construction de systèmes d'expression de la méthionyl-sérum-albumine humaine

a. Utilisation du promoteur " P_L " du bactériophage lambda

On linéarise le plasmide "pXL53" par digestion partielle par l'enzyme NcoI, en ne considérant que le site NcoI en 5' du codon d'initiation et on forme des bords francs par remplissage selon la technique de R.M. Wartell et W.S. Reznikoff, Gene (1980), 9, p. 307 et suivantes).

On synthétise un "adaptateur" contenant en 5' une séquence correspondant au site de reconnaissance d'une enzyme de restriction telle que BamHI, puis une séquence correspondant à un site de fixation de ribosomes (RBS "consensus" ou "théorique"). La séquence de l'adaptateur est : 5'GGATCCTAGGAGGAAC 3'.

La ligature de l'adaptateur en 5' d'un ADN à bords francs a été décrite, par exemple, par C.P. Bahi et coll., Gene (1976), 1, p. 81 et suivantes.

La méthode consiste à effectuer la réaction sur 20 microlitres d'une solution contenant 50 mM Tris, HCl pH = 7,6, 10 mM MgCl₂, 15 mM DTT, 1 mM ATP, 50 µg/ml d'adaptateur, 20 µg/ml d'ADN et 1 unité d'ADN-ligase (New England Biolabs Inc.). La réaction est poursuivie pendant 10 heures à 15°C. Cette ligature crée un site BamHI sans supprimer le site NcoI.

On digère le produit de ligation par BamHI et par HinDIII. Du fait de la présence d'un site HinDIII en 3' du gène de la sérum-albumine humaine, on obtient un fragment d'ADN contenant la totalité de la séquence codante.

On sous-clone le fragment HinDIII-BamHI ainsi obtenu par exemple dans le plasmide "pBR322" en trans-formant E.coli selon la méthode déjà décrite ci-dessus pour obtenir le plasmide "pXL61".

Le plasmide "pXL61" ne contient pas de promoteur.

Le promoteur " P_L " du bactériophage lambda est placé sur le chromosome du bactériophage entre un site BgII et un site BamHI (voir E. Szybalski et W. Szybalski, Gene (1979) 7, p. 217 et suivantes), et dont la séquence nucléotidique est connue (F. Sanger et coll., J. Mol. Biol. (1982), 162, p. 279 et suivantes). On peut cloner ce fragment et modifier ses sites de restriction selon des méthodes connues.

On note que les plasmides portant P_L doivent être propagés dans des souches de E.coli portant le gène répresseur cI , ceci afin d'éviter que ce promoteur ne s'exprime de façon constitutive.

Dans une première construction, P_L est disponible sous forme d'un fragment BamHI à partir du plasmide "pPL-lambda" (Pharmacia P.L. Biochemicals). L'insertion de ce fragment BamHI dans le site BamHI du plas-

mida "pXL61" permet d'obtenir le plasmide "pXL65", dans lequel on a vérifié que l'orientation du promoteur par rapport au gène de structure de la sérum-albumine humaine est correcte.

D'autres constructions peuvent être réalisées à partir de plasmides disponibles. On peut, par exemple, exciser du plasmide "pP_L-lambda" un fragment HaeIII-HaeIII contenant le promoteur P_L et l'insérer dans le site SmaI d'une séquence de clonage multitesine portée sur un plasmide, tel que le plasmide "pUCB" (J. Vieira et J. Messing, Gene, (1982), 79, p. 259 et suivantes) pour obtenir "pUC8-P_L" dans lequel le site EcoRI est en 5' du promoteur.

A partir du plasmide "pPS1" (P. Sarmientos et coll., Cell (1983), 32, p. 1337 et suivantes), on peut d'abord détruire le site HinDIII le plus proche du site NdeI (figure 3) puis remplacer le petit fragment EcoRI-HinDIII par, d'une part, le fragment EcoRI-BamHI du plasmide "pUC8-P_L" contenant le promoteur P_L, et, d'autre part, le fragment BamHI-HinDIII du plasmide "pXL61" contenant le gène de la sérum-albumine. On obtient ainsi le plasmide "pXL70" dans lequel l'ensemble P_L-RBS "consensus" -ATG-gène de la sérum-albumine humaine est porté sur un fragment d'ADN EcoRI-HinDIII.

15 b. Remplacement du RBS "consensus" par celui du gène cII du bactériophage lambda

Le gène cII du bactériophage lambda, dont la séquence et le site d'initiation sont connus, peut être traduit avec efficacité (E. Schwarz et coll., Nature (1978), 272, p. 410 et suivantes).

On construit un plasmide contenant le système d'expression "Promoteur P_L - RBS cII - ATG - gène sérum-albumine".

Par exemple, on peut après avoir détruit le site BamHI de "pUC8-P_L" par action de l'enzyme SI (A.J. Berk et P.A. Sharp, Cell (1977), 12, p. 772) isoler un fragment EcoRI-HinDIII contenant le promoteur P_L et anschließen ce fragment avec le grand fragment EcoRI-HinDIII du plasmide "pDS20" (G. Duester et coll., Cell (1982), 30, p. 855 et suivantes), pour obtenir le plasmide "pXL73".

Le RBS du gène cII est extrait du plasmide "pPS1". On dirige ce plasmide par NdeI et on insère un adaptateur BamHI après formation d'extrémités franches. On excise alors le RBS sous forme d'un fragment HinDIII-BamHI.

On construit d'abord un plasmide "pXL88" dans lequel ce fragment HinDIII-BamHI est lié au grand fragment HinDIII-BamHI du plasmide "pXL73". Dans ce nouveau plasmide "pXL88", le RBS cII est inséré dans la bonne orientation par rapport au promoteur P_L, le tout dans un système multitesine de telle sorte que l'ensemble P_L-RBS cII soit porté sur un fragment d'ADN EcoRI-BamHI de 578 paires de bases.

Le fragment EcoRI-BamHI de 578 paires de bases est sous-cloné entre les sites EcoRI et BamHI du plasmide "pMC1403" (M.J. Casadaban et coll., J. Bacteriol. (1980), 143, p. 971 et suivantes) qui porte le gène de la β -galactosidase (lacZ) après le site BamHI. Cette construction conduit au plasmide "pXL91" dans lequel le gène de la β -galactosidase est exprimé sous contrôle du système "P_L-RBS cII".

On sous-clone le fragment BamHI-BglII du plasmide "pXL61" décrit précédemment dans le site BamHI du plasmide "pMC1403". (La ligaison d'un site BglII dans un site BamHI est possible, mais l'excision par BamHI en BglII ne l'est plus ; il ne reste donc qu'un site BamHI).

Cette construction ("pXL71") aboutit à l'insertion d'un fragment d'ADN de 700 paires de bases comportant la séquence "BamHI-[RBS "consensus"-ATG-Ncol-gène partiel de la sérum-albumine -(codant pour les acides aminés 1 à 218)-gène de la β -galactosidase].

On coupe ce plasmide par BamHI et SacI (le site SacI est présent dans le gène de la β -galactosidase) et on l'insère dans le plasmide "pXL91" décrit précédemment à la place du fragment préexistant BamHI-SacI.

On aboutit alors au plasmide "pXL97" dont l'insertion a la structure suivante : "Site EcoRI - P_L - RBS cII - site BamHI-RBS "consensus"- site Ncol - ATG - gène partiel de la sérum-albumine -gène de la β -galactosidase".

On dirige le plasmide "pXL97" par BamHI et partiellement par Ncol en ne considérant que le site Ncol proche du codon d'initiation et on forme les bords francs par action de la nuclease SI, puis on le referme sur lui-même. Cette manipulation, d'une part, supprime la séquence d'ADN du RBS "consensus" et, d'autre part, met en phase un ATG du RBS cII avec la séquence de la sérum-albumine.

On obtient ainsi le plasmide "pXL136" qui comporte la séquence "site EcoRI-P_L-RBS cII-ATG-gène partiel de la sérum-albumine-gène de la β -galactosidase".

Le gène partiel de la sérum-albumine possédant un site Pvull, on dirige le plasmide "pXL136" par EcoRI et Pvull et on extrait un fragment de 760 paires de bases qui est inséré entre les sites EcoRI et Pvull du plasmide "pXL70" décrit précédemment. On obtient ainsi le plasmide "pXL139" qui porte la structure "P_L-RBS cII-gène sérum-albumine complet" sur un fragment EcoRI-HinDIII, comme le plasmide "pXL70" et qui porte la substitution RBS "consensus" par celui du gène cII.

On coupe le plasmide "pXL139" décrit précédemment au site unique Sall, entre le promoteur P_L et le RBS

EP 0 236 210 B1

A. SEQUENCES DES ACIDES AMINES DES DIFFERENTS SEGMENTS "PSEUDO-PRO"

CH1-SAH: MET VAL ARG ALA ASN LYS ARG-ASP
ATG GTT CGT GCA AAC AAA CGC GAT...
b1SAH

PAM1: MET LYS ASN ARG ASN ARG-ASP
ATG AAA AAT AGA AAT CGT GAT...

PAM2: MET LYS ASN ARG LYS ARG-ASP
ATG AAA AAT AGA AAA CGT GAT...

PAM3: MET LYS LYS ARG LYS ARG-ASP
ATG AAA AAA AGA AAA CGT GAT...

cll. On digrèe l'ADN par l'enzyme Ba131, de telle sorte que le site de fin de transcription tR1 en 5' du RBS cll soit digréé puis on ajoute un adaptateur HinDIII et on isole le fragment HinDIII-XbaI contenant le RBS cll amputé de tR1 et les 357 premiers codons du gène de la sérum-albumine humaine. On combine ce fragment HinDIII-XbaI avec d'une part le fragment XbaI-EcoRI du plasmide pXL139 contenant la fin du gène de la sérum-albumine humaine et d'autre part le fragment EcoRI-HinDIII portant le promoteur P_c obtenu à partir du plasmide pUCB-P_c après destruction du site BamHI. On obtient ainsi le plasmide pXL324.

4. Construction d'un plasmide d'expression pour la "pseudo-pro-SAH"

10 Un fragment d'ADN est construit par hybridation de deux oligonucléotides synthétiques ayant la structure donnée dans la figure 6A. La séquence contient un codon de démarcage "ATG" suivi par les 6 premiers codons du gène cll du bactériophage lambda. Ce fragment possède une extrémité cohésive de type HinDIII et une autre extrémité cohésive de type Sall. Ce fragment synthétique est cloné entre les sites HinDIII et Sall du vecteur M13mp10 (J. Messing, Methods Enzymol., (1984), 101, p.20 et suivantes). Le DNA en forme réplicative purifié à partir de cellules infectées par le bactériophage résultant est utilisé dans l'étape suivante de construction.

15 Un fragment Sall-BglII de 765 paires de bases provenant du plasmide pXL324 contenant le début du gène (ADNc) codant pour la SAH est cloné dans ce bactériophage recombinant. La souche de E.coli JM101 est infectée par ce nouveau bactériophage et le surmajeant d'une culture de 5 heures est utilisé comme source de particules phagiques contenant l'ADN simple brin caractéristique des phages filamentés de type M13. Ce simple brin sert ensuite de matrice pour une mutagénèse dirigée par oligonucléotide permettant de supprimer la séquence comprise entre le sixième codon du gène cll et le premier codon de la SAH mature (GAT) selon les méthodes décrites, par exemple, par J.P. Adelman et coll., DNA (1985), 2, p.183. L'oligonucléotide utilisé dans

meutant de réaliser cette suppression est représenté par la figure 11A. La séquence modifiée est ensuite substituée dans le plasmide "pXL288" pour donner le plasmide "pXL641" dont la structure est la suivante : "EcoR1-Ptrp-SaiI-[promoteur PAM-RBS PAM-séquence nucléotidique codant pour PAM1]-gène SAH".

Deux dérivés de la séquence "PAM1" sont construits par mutagénèse dirigée par oligonucléotide, après sous-clonage dans le bactériophage M13mp18amIV, selon la méthode décrite par P. CARTER et coll., *Nucl. Acids Res.*, 1985, 13, p.4431 et suivantes. Les oligonucléotides permettant de réaliser cette mutagénèse sont représentés dans les figures 11B et 11C. Après reconstruction, deux plasmides analogues au plasmide "pXL641" contenant les séquences codant pour "PAM2" (Met Lys Asn Arg Lys Arg-) ; plasmide "pXL740" et "PAM3" (Met Lys Lys Arg Lys Arg-) ; plasmide "pXL741" sont obtenus (figure 10).

Après introduction des plasmides "pXL641", "pXL740" et "pXL741" dans une souche appropriée de *E.coli* telle que *E.coli* 54125 (Collection de l'Institut Pasteur), on obtient des souches produisant respectivement les protéines hybrides PAM1-SAH, PAM2-SAH et PAM3-SAH à des taux de l'ordre de 5 à 10 mg/dl de milieu pour une absorbance de 1 à 610 nm en opérant dans les conditions décrites dans la demande de brevet européen EP 864 00618.4 (200590).

La protéine hybride se trouve dans la fraction insoluble du lysat cellulaire et peut être renaturée et partiellement purifiée selon les méthodes décrites précédemment. Chaque protéine hybride obtenue après renaturation peut être convertie en SAH mature par digestion ménagée au moyen d'une concentration optimisée de trypsin dans les conditions décrites précédemment.

Conformément aux dispositions du Traité de Budapest, ont été déposés au CBS à Baam (Pays-Bas) le 3 février 1987 :

- Un échantillon du microorganisme *E.coli* E103S (pRK 248 cl⁸) contenant le plasmide pXL 462 (souche G-1398) sous le numéro CBS 143-87.
- Un échantillon du microorganisme *E.coli* B contenant le plasmide pXL 641 (souche G-2083) sous le numéro CBS 144-87.
- Un échantillon du microorganisme *E.coli* B contenant le plasmide pXL 740 (souche G-2146) sous le numéro CBS 145-87.
- Un échantillon du microorganisme *E.coli* B contenant le plasmide pXL 741 (souche G-2147) sous le numéro CBS 146-87.

30

Revendications

1. Procédé de préparation de la sérum-albumine humaine mature caractérisé en ce que :

- dans une première étape on prépare une protéine hybride contenant une extension peptidique N-terminale hydrophile de 5 à 8 acides aminés, et de préférence 6 à 7, terminée par un site de coupure par la trypsin, fusionnée avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, par culture d'une souche d'*E.coli* capable d'assurer le maintien d'un plasmide contenant la séquence nucléotidique codant pour ladite protéine hybride, dont l'expression est contrôlée par un promoteur bactérien inducible,
- dans une deuxième étape, on convertit la molécule dénaturée et insoluble ainsi obtenue en molécule renaturée et soluble, en utilisant une méthode de dénaturation et renaturation permettant un réarrangement des structures secondaire et tertiaire de la chaîne polypeptidique, et
- dans une troisième étape, on convertit cette protéine hybride par la trypsin en une protéine identique en structure primaire à la sérum-albumine humaine mature.

2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que les codons codant pour l'extension peptidique

35

N-terminale sont choisis parmi les sept premiers codons du gène cl¹ du bactériophage lambda et les six premiers codons du gène de la pénicilline amidase éventuellement transformés par mutagénèse dirigée.

3. Le plasmide "pXL462" déposé sous le numéro CBS 143-87 caractérisé en ce qu'il contient le promoteur P_L, le site de fixation des ribosomes du gène cl privé du signal de terminaison de la transcription tR1, le codon d'initiation ATG et les six premiers codons du gène cl fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

40

4. Le plasmide "pXL641" déposé sous le numéro CBS 144-87 caractérisé en ce qu'il contient le promoteur Ptrp suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons du gène de la pénicilline amidase fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

45

5. Le plasmide "pXL740" déposé sous le numéro CBS 145-87 caractérisé en ce qu'il contient le promoteur Ptrp suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons d'un gène de la pénicilline amidase modifié par mutagénèse dirigée codant pour le polypeptide Met-Lys-Asn-Arg-Lys fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine

EP 0 236 210 B1

2. Sonication, récupération de la cli-SAH

Le culot cellulaire collecté par centrifugation est resuspendu dans 1/30 de volumes de PBS (0,2 ml KC1.

the first six codons of a penicillin amidase gene modified by directed mutagenesis coding for the Met-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg polypeptide fused with the structural gene of mature human serum albumin.

7. The hybrid protein comprising a hydrophilic N-terminal peptide extension containing 5 to 8, and preferably 6 to 7, amino acids, terminated by a site for cutting with trypsin, which is fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, when it is produced by culture of a strain of E.coli according to Claim 1.

8. The hybrid protein according to Claim 7, comprising at the N-terminal and the first seven amino acids of the lambda bacteriophage cII protein, (Met)-Val-Arg-Ala-Asn-Lys-Arg, which are fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, when it is produced by culture of a strain of E.coli capable of assuring the conservation of the plasmid "pXL462" defined in Claim 3.

10. The hybrid protein according to Claim 7, comprising at the N-terminal end the first six amino acids of penicillin amidase, Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg, fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, when it is produced by culture of a strain of E.coli capable of ensuring the conservation of the plasmid "pXL641" defined in Claim 4.

10. The hybrid protein according to Claim 7, comprising at the N-terminal end the first six N-terminal amino acids of a penicillin amidase modified by directed mutagenesis, Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg, fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, when it is produced by culture of a strain of E.coli capable of ensuring the conservation of the plasmid "pXL740" defined in Claim 5.

11. The hybrid protein according to Claim 7, comprising at the N-terminal and the first six amino acids of a penicillin amidase modified by directed mutagenesis, Met-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg, fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, when it is produced by culture of a strain of E.coli capable of ensuring the conservation of the plasmid "pXL741" defined in Claim 6.

Patentansprüche

25. 1. Verfahren zur Herstellung von reifem menschlichem Serum-albumin, dadurch gekennzeichnet, daß man
– in einer ersten Stufe ein Hybridprotein herstellt, das eine hydrophile N-endsständige Peptidverlängerung
von 5 bis 8, vorzugsweise 6 bis 7 Aminosäuren, abgeschlossen durch eine Trypsinschnittstelle, fusioniert
mit der Peptidsequenz des reifen menschlichen Serumalbumins, herstellt durch Züchtung eines Stammes
von E.coli, der den Bestand eines Plasmids zu gewährleisten vermag, das die für das Hybridprotein, des-
sen Expression durch einen induzierbaren bakteriellen Promotor regulierbar ist, codierende Nukleotidse-
quenz enthält,
– in einer zweiten Stufe das so erhaltene denaturierte und unlösliche Molekül in ein renaturiertes und lös-
liches Molekül umwandelt, indem man eine Denaturierungs- und Renaturierungs-methode anwendet, die
eine Umlagerung sekundärer und tertiärer Strukturen der Polypeptidkette ermöglicht, und
– in einer dritten Stufe dieses Hybridprotein mit Trypsin in ein Protein umwandelt, das in der Primärstruktur
dem reifen menschlichen Serumalbumin identisch ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die die N-endständige Peptidverlängerung
codierenden Codons aus gewählt sind aus den sieben ersten Codons des Gens cII das Bakteriophagen
Lambda und den sechs ersten Codons des Gens von Penicillinamidase, gegebenenfalls transformiert durch
gerichtete Mutagenese.

3. Plasmid "pXL462", hinterlegt unter der Nummer CBS 143-87, dadurch gekennzeichnet, daß es den Pro-
motor P_{cII} , die Bindestelle der Ribosomen des Gens cII, abgeschlossen durch das Transkriptionsterminations-
signal tR1, das Startcodon ATG und die sechs ersten Codons des Gens cII, fusioniert mit dem Strukturen des
reifen menschlichen Serumalbumins, enthält.

4. Plasmid "pXL641", hinterlegt unter der Nummer CBS 144-87, dadurch gekennzeichnet, daß es den Pro-
motor Ptp, gefolgt vom Promotor der Penicillinamidase, die Bindestelle der Ribosomen des Gens der Penicil-
linamidase und die sechs ersten Codons des Gens der Penicillinamidase, fusioniert mit dem Strukturen des
reifen menschlichen Serumalbumins, enthält.

5. Plasmid "pXL740", hinterlegt unter der Nummer CBS 145-87, dadurch gekennzeichnet, daß es, den Pro-
motor Ptp, gefolgt vom Promotor der Penicillinamidase, die Bindestelle der Ribosomen des Gens der Penicil-
linamidase und die sechs ersten Codons des Gens der durch gerichtete Mutagenese modifizierten Penicillinamidase, die für das Polypeptid Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg codieren, fusioniert mit dem Strukturen des
reifen menschlichen Serumalbumins, enthält.

55. 6. Plasmid "pXL741", hinterlegt unter der Nummer CBS 146-87, dadurch gekennzeichnet, daß es den Pro-
motor Ptp, gefolgt vom Promotor der Penicillinamidase, die Bindestelle der Ribosomen des Gens der Penicil-
linamidase und die sechs ersten Codons eines Gens der durch gerichtete Mutagenese modifizierten Penicillinamidase, die für das Polypeptid Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg codieren, fusioniert mit dem Strukturen

des reifen menschlichen Serumalbumins, enthält.

7. Hybridprotein, umfassend eine hydrophile N-endständige Peptidverlängerung von 5 bis 8, vorzugsweise 6 bis 7 Aminosäuren, abgeschlossen durch eine Trypsinschnittstelle, fusioniert mit der Peptidsequenz reifen menschlichen Serum-albumins, erhalten durch Züchtung eines Stammes von E.coli nach Anspruch 1.

5 8. Hybridprotein nach Anspruch 7, umfassend am N-endständigen Ende die sieben ersten Aminosäuren des Proteins cII des Bakteriophagen Lambda, (Met)-Val-Arg-Ala-Asn-Lys-Arg, fusioniert mit der Peptidsequenz des reifen menschlichen Serumalbumins, erhalten durch Züchtung eines Stammes von E.coli, der den Bestand des im Anspruch 3 definierten Plasmids "pXL462" zu gewährleisten vermag.

10 9. Hybridprotein nach Anspruch 7, umfassend am N-endständigen Ende die sechs ersten Aminosäuren der Penicillinamidase, Met-Lys-Asn-Arg-Asn-Arg, fusioniert mit der Peptidsequenz des reifen menschlichen Serumalbumins, erhalten durch Züchtung eines Stammes von E.coli, der den Bestand des im Anspruch 4 definierten Plasmids "pXL841" zu gewährleisten vermag.

15 10. Hybridprotein nach Anspruch 7, umfassend am N-endständigen Ende die sechs ersten Aminosäuren der durch gerichtete Mutagenese modifizierten Penicillinamidase, Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg, fusioniert mit der Peptidsequenz des reifen menschlichen Serumalbumins, erhalten durch Züchtung eines Stammes von E.coli, der den Bestand des im Anspruch 5 definierten Plasmids "pXL740" zu gewährleisten vermag.

15 11. Hybridprotein nach Anspruch 7, umfassend am N-endständigen Ende die sechs ersten Aminosäuren der durch gerichtete Mutagenese modifizierten Penicillinamidase, Met-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg, fusioniert mit der Peptidsequenz des reifen menschlichen Serumalbumins, erhalten durch Züchtung eines Stammes von E.coli, der den Bestand des im Anspruch 6 definierten Plasmids "pXL741" zu gewährleisten vermag.

25

30

35

40

45

50

55

humaine mature.

6. Le plasmide "pXL741" déposé sous le numéro 146-87 caractérisé en ce qu'il contient le promoteur P_{trp} suivi du promoteur de la pénicilline amidase, le site de fixation des ribosomes du gène de la pénicilline amidase et les six premiers codons d'un gène de la pénicilline amidase modifié par mutagénèse dirigée codant pour le polypeptide Met-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg fusionnés avec le gène de structure de la sérum-albumine humaine mature.

7. La protéine hybride comprenant une extension peptidique N-terminale hydrophile de 5 à 8 acides aminés, et de préférence 6 à 7, terminée par un site de coupe par la trypsin, fusionnée avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E. Coli selon la revendication 1.

8. La protéine hybride selon la revendication 7 comprenant à l'extrémité N-terminale les sept premiers acides aminés de la protéine cil de bactériophage lambda, (Met)-Val-Arg-Ala-Asn-Lys-Arg, fusionnés avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E. Coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL462" défini dans la revendication 3.

9. La protéine hybride selon la revendication 7 comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés de la pénicilline amidase, Met-Lys-Asn-Arg-Asn-Arg, fusionnés avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E. Coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL641" défini dans la revendication 4.

10. La protéine hybride selon la revendication 7 comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés d'une pénicilline amidase N-terminale modifiée par mutagénèse dirigée, Met-Lys-Asn-Arg-Lys-Arg, fusionnés à la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E. coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL740" défini dans la revendication 5.

11. La protéine hybride selon la revendication 7 comprenant à l'extrémité N-terminale les six premiers acides aminés d'une pénicilline amidase modifiée par mutagénèse dirigée, Met-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg, fusionnés avec la séquence peptidique de la sérum-albumine humaine mature, lorsqu'elle est obtenue par culture d'une souche d'E. coli capable d'assurer le maintien du plasmide "pXL741" défini dans la revendication 6.

Claims

30. 1. Process for the preparation of mature human serum albumin, characterised in that:

– in a first stage a hybrid protein is prepared containing a hydrophilic N-terminal peptide extension containing 5 to 8, and preferably 6 to 7, amino acids, terminated by a site for cutting with trypsin, which is fused with the peptide sequence of mature human serum albumin, by culture of a strain of E. coli capable of ensuring the conservation of a plasmid containing the nucleotide sequence coding for the said hybrid protein, whose expression is controlled by an inducible bacterial promoter,
 35 – in a second stage the denatured and insoluble molecule thus obtained is converted into a renatured and soluble molecule by using a denaturating and renaturating method permitting a rearrangement of the secondary

Carte de restriction du gène de l'albumine humaine et position des insertions

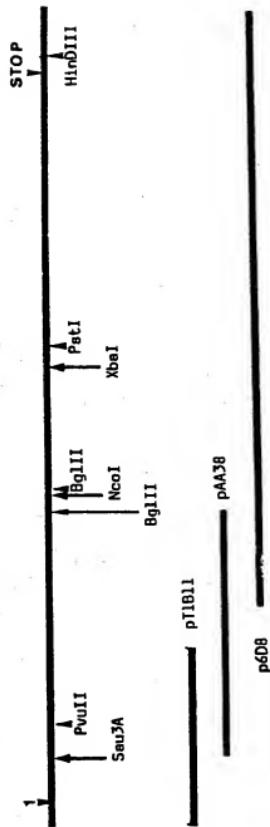


Figure 2

Le chiffre 1 correspond au 1er acide aminé de l'albumine humaine.
 L'insertion du plasmide "pT1B11" s'étend au-delà de l'extrémité 5',
 vers la séquence de la proalbumine.

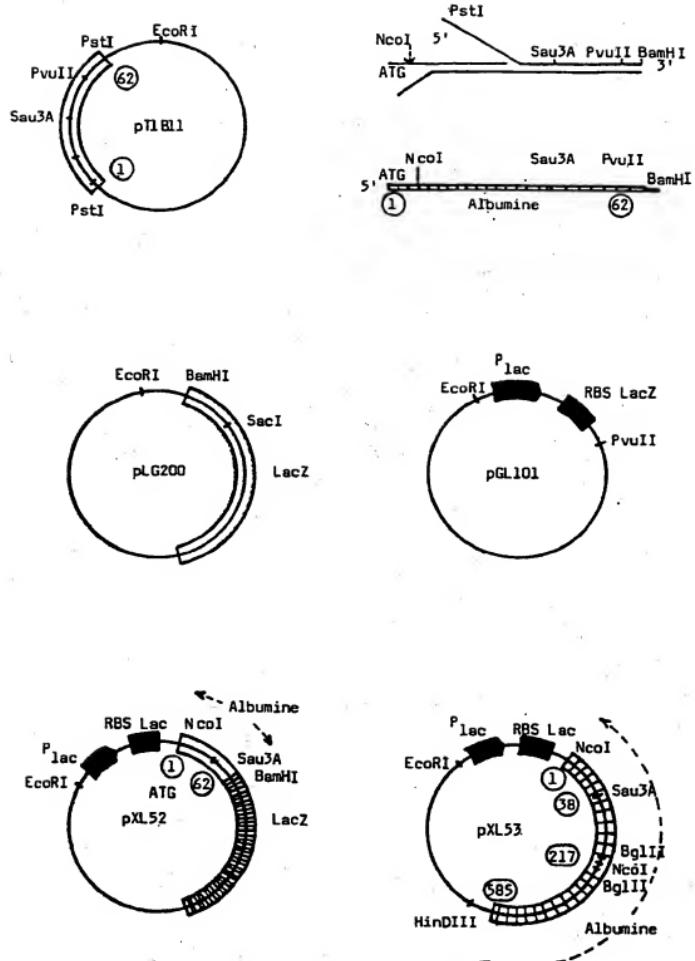


Figure 3

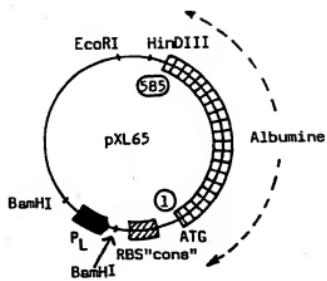
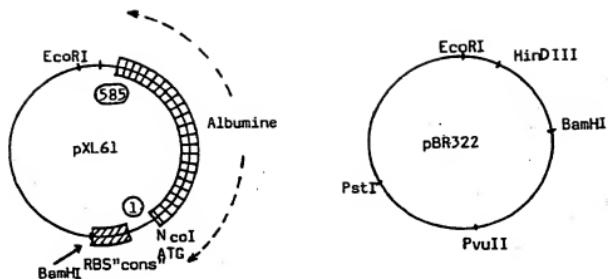


Figure 3.

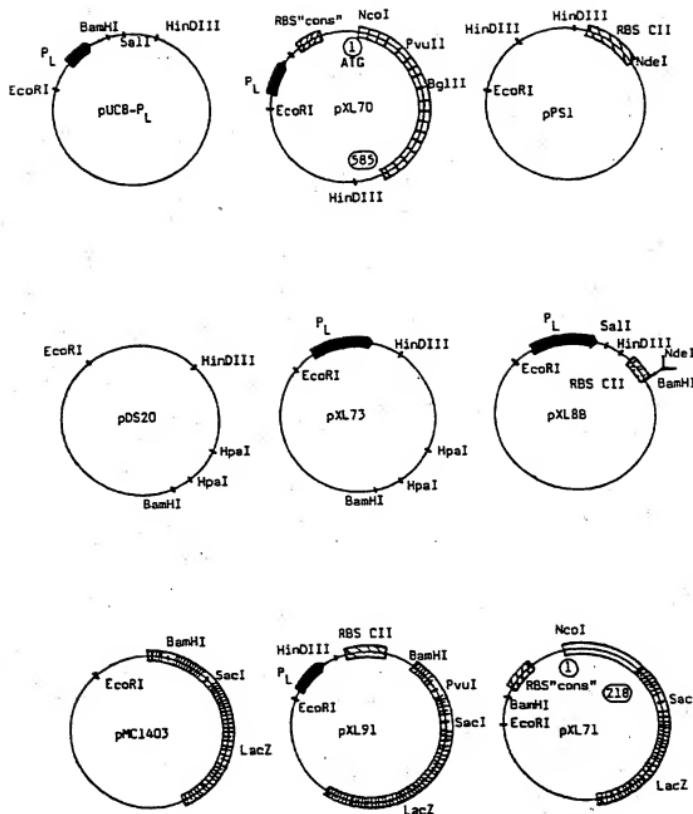


Figure 3

SEQUENCE DE L'INSERTION DE pX153

Figure 4

EP 0 236 210 B1

870 900 910 920 930 940 950 960
 CAGGGGGACCTGGCAAAGTATATCTGTGAAATCAAGATTGATCTCCACTAACTGAAGGAATGCTGTGAAAAACCTC
 GTCGGCGCTGGAACGGTCAATAGAACACTTTAGCTAAGCTAGAGGTCAATTGACTTCCTTAGACACTTTTGAG
 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040
 TGTGGAAAATCCCACTGCATGGCCGAAAGTGGAAATGATGAGATGGCTGCTGACTTGGCCTTCATTAAGGCCCTGATT
 ACAACCTTTAGGGTCACTGAACTAACGGCTTACACCTTACTACTCTAACGGGACTGAACGGAAAGTAAACGCCGACTTAAA
 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 GTTGAAGTAAGGATGTTGCAAAACTATGCTGAGGCCAAGGGATGCTCTGGGATGTTTGTATGAATAATGCCAAG
 CAACTTCATTCTACAAACGTTTGTACGACTCGTTCCACAGAACCCSTACAAAAGATACTTATAACGTT
 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAGGCACTCTGATTACTCTGCTGACTGCTGAGACTTGGCAAGACATGAAACACTCTAGAGAAGTGCCTGGCG
 TTCCGTAAGGACTTAATGAGAACGGATGACGAGACTGAAACGGTTCTGTATACTTTGGTAGATCCTTCACGACGGC

Figure 4 (suite)

EP 0 236 210 B1

540

AGC

TCG

20

TC

AG

100

CA

GT

180

GA

CT

605	620	635	650	665	680	695	710	725	740	755	770	785	800	815	830	
AGG TAT AAA GCT TTT ACA GAA TGT TGC CAA GCT GCT GAT AAA GCA GGC TGC CTG TGG	CCA AAG CTC CAT GAA CTT CGG GAT GAA GGG AAG GCT TCG TCT GCT AAA CAG AGA CTC AAG	PRO LYS LEU ASP GLU LEU ARG ASP GLU GLY LYS ALA SER SER ALA LYS GLN ARG LEU LYS	TGT GCC AGT CTC CAA AAA TTT GGA GAA AGA GCT TTC AAA GCA TGG GCA GTC GCT CGC CTG	CYS ALA SER LEU GLN LYS PHE GLY GLU ARG ALA PHE LYS ALA TRP ALA VAL ALA ARG LEU												

AGG TYR LYS ALA ALA PHE THR GLU CYS CYS GLN ALA ALA ASP LYS ALA ALA CYS LEU LEU

Figure 5 (suite)

EP 0 236 210 B1

10

AT

SH

70

AG

LU

30

TA

EII

911

AA

YS

585

1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920||
 TCTGCAAGTCAGGCTGCCCTAGCCCTATAACATCACATTAAAGGATCTAGGCCCTACCATGAGAATANGAGAAGAAA
 ACGACGTTCACTTCGACGGAACTCGAAATTCTGACTGTAAATTTCGTTAGACTCTTATTCTCTTTCTTT

1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000||
 ATGAAAGATCAAAGCTTATTCATTCTGTCTTTCTGGCTGTTCAATTAAAGCCAAACCCCTGCTAAAAAACATAATT
 TACTCTAGTTTCGAAATAAGTAAGACAAAGAAAAGCAACCAATTTCGGTTGGACAGATTTTGTATTAA

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080||
 TCTTAATCACTTTAATCAATTGGCTCTTTCTGTGCTCAATTAAAGAAATCTAAAAAACCC
 AGAAATTAGCAAAATTAGTAAACCGGAGAAAAGACACCAAGTTAAATTATTTTACCTTCTTAGATTTTGGGG

2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160||
CCCCCCCCCCCCCTGGCAGCAATAGGCAACAAACGTTGCGCAACTATTAACTGGCGAA
GGGGGGGGGGGGGACGCTGGTTATCGTTGCAACCGTTGATAATTGACCGCTT

Figure 4 (suite)

EP 0 236 210 B1

00

AC

TG

BL

AA

TT

60

AT

1A

40

GT

CA

1260 1260 1270 1280
:CTCTTATGGAAGAGCCTCGAAATTAAATCAA
:GAGAATAACCTTCTGGAGCTTAATTAGTT

330 1340 1350 1360
TGGCTTATTAGTTCGTTACCCAAAGAAAGTACC
ACCCGATAATCAAGCATGTGGTTCTTCTATGG

410 1420 1430 1440
AAGTGGCAGCAAATGTGTAAACATCCCTGAAG
TTAACCGGTGGTTACACATTCTAGGACTC

490 1500 1510 1520
:CAGTTATGTGTGTGATGAGAAAACGGCAGTA
:GTCAATAACACACACAGTACTCTTTGGGTCAAT

70 300 310 320
CTGAAAATTGACAATCACTCTATACCTT
GACTTTAACACTGTTACCTAAGTATGGAA

70 380 390 400
GAAATGGCTGACTGGCTGTGCAAAACAGAACCC
CTTACCGACTGACGACGACGTTCTCTGG

50 460 470 480
CCCCGATGGTGAAGGAGAGGTTGATGTA
GGGGCTTAACCACTCTGGCTCCAACACACT

30 540 550 560
TATATGAAATTCCAGAGGACATCTCTACIT
ATATACCTTAACGGTCTCTGTAGGAATGAA

1325	1340	1355	1370	
GAC TAC AAA TTC CAG AAT GCG CTA TTA GTT CGT TAG ACC AAG AAA GTC CCC CAA GTG TCA				
GLU TYR LYS PHE GLN ASN ALA LEU LEU VAL ARG TYR THR LYS VAL PRO GLN VAL SER				
1365	1380	1400	1415	1430
ACT CCA ACT CTT GTA GAG GTC TCA AGA AAC CTA GGA AAA GTG GGC AGC AAA TGT TGT AAA				
THR PRO THR LEU VAL GLU VAL SER ARG ASN LEU GLY LYS VAL GLY SER LYS CYS CYS LYS				
1445	1460	1475	1490	1505
CAT CCT GAA GCA AAA AGA ATG CCC TGT GCA GAA GAC TAT GTC TCC GTG GTC CTG AAC CAG				
HIS PRO GLU ALA LYS ARG MET PRO CYS ALA GLU ASP TYR LEU SER VAL VAL LEU ASN GLN				
1520	1535	1550		
TTA TGT GTG TTG CAT GAG AAA AGC CCA GTC AGT GAC AGA GTC ACC AAA TGC TGC ACA GAA				
LEU CYS VAL LEU HIS GLU LYS THR PRO VAL SER ASP ARG VAL THR LYS CYS CYS THR GLU				

Figure 5 (suite)

EP 0 236 210 B1

.30

:CT

:RO

70

AG

YS

50

:CT

:RO

10

GA

LY

A. Oligonucléotide codant pour les 6 premiers codons du gène cII

Met Val Arg Ala Asn Lys Arg
5'-AGCTTCAATATGGTTCGTGC^{AAACAAACGCG}-3'
3'-AGTATACCAAGCAGCTTGT^{TTGCGCAGCT}-5'

B. Oligonucléotide utilisé pour la Mutagénèse par déletion.

5'-TCGTGCAAACAAACGCGCATGCACACAAGAGT-3'
cII SAH

OLIGONUCLEOTIDES SYNTHETIQUES
EMPLOYES DANS LA CONSTRUCTION DE
LA cII-SAH

Figure 6

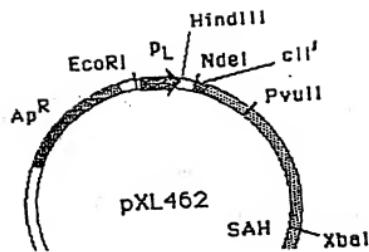
EP 0 236 210 B1

50

GT

ER

EP 0 236 210 B1



1595

GAA GTC GAT GAA ACA TAC GTT CCC
GLU VAL ASP GLU THR TYR VAL PRO

1610

1655

GAT ATA TGC ACA CTT TCT GAG AAG
ASP ILE CYS THR LEU SER GLU LYS

1670

1715

CTT GTG AAA CAC AAG CCC AAG GCA
LEU VAL LYS HIS LYS PRO LYS ALA

1730

1775

GCA GCT TTT GTA GAG AAG TGC TGC
ALA ALA PHE VAL GLU LYS CYS CYS

1790

875 890

AA TGT GCT GAT GAC AGG GCG GAC
LU CYS ALA ASP ASP ARG ALA ASP

935 950

TCC AGT AAA CTG AAG GAA TGC TGT
BER SER LYS LEU LYS GLU CYS CYS

995 1010

GAA GTC GAA AAT GAT GAG ATG CCT
GLU VAL GLU ASN ASP GLU MET PRO

1055 1070

AGT AAG GAT GTT TGC AAA AAC TAT
BER LYS ASP VAL CYS LYS ASN TYR

pRLS5

170

T AAA GAT TTC GGA GAA GAA AAA TTC
 T GAG GAG TGT CCA TTT GAA GAT GAT
 T GLN GLN CYS PRO PHE GLU ASP HIS
 T LYS ASP LEU GLY GLU GLU ASN PHE

175

230

T GAG GAG TGT CCA TTT GAA GAT GAT
 T GLN GLN CYS PRO PHE GLU ASP HIS
 T LYS ASP LEU GLY GLU GLU ASN PHE

215

290

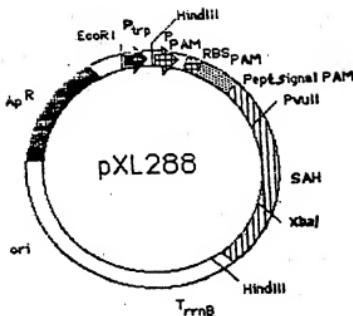
A ALA TGT GTT GCT GAT GAG TCA GCT
 S THR CYS VAL ALA ASP GLU SER ALA

275

T GAC AAA TTA TGC AGA GTT GCA ACT
 Y ASP LYS LEU CYS THR VAL ALA THR

325

350



Plasmide d'expression de la fusion "Peptide signal PAM-SAH"

EcoRI
GGATTCCCTTGTACGATTAATCTGCGACTAGTTAACCTGATCCGAGCTTGGCTCGAGGT
 Promoteur Tryptophane

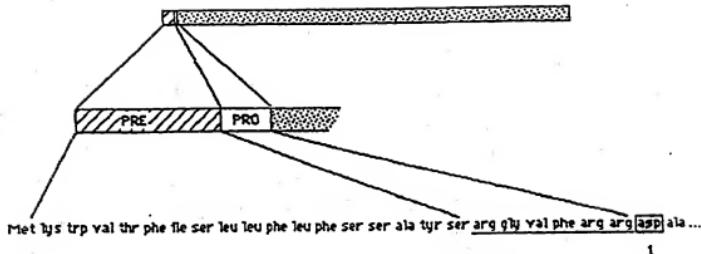
HindIII
CGACCTGCGCCAGCTTCTTGTGCTCTAGTATCGATTCGCTTAATTTACACCTGCGAGGGATACG
 Promoteur et Site de fixation des ribosomes de PAM

ATG AAA AAT AGA PRT CGT ATG ATC GTG AAC TGT GTT ACT GCT TCC CTG
 Met Lys Asn Arg Phe Arg Met Ile Val Asn Cys Val Thr Ala Ser Leu
 séquence signal de la PAM
 <----- séquence déletée pour construire

ATG TAT TAT TGG AGC TTR CCT GCA CTG GCT GAT GCA CGC ARG...
 Met-Tyr Tyr Trp Ser Leu Pro Ala Leu Ala Asp Ala His Lys...
 SHM
 PAM1-SAH

Séquence des signaux d'expression et du début de la fusion
 "Peptide signal PAM-SAH" de pXL288.

Figure 9



1

STRUCTURE DE LA "PREPRO-SAH"